

Vânia Patrícia Alves Pereira

Avaliação do Prazo de Validade de Conservas de Peixe Após Abertura

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Controlo
de Qualidade – *Especialização em Água e Alimentos*

Trabalho realizado sob a orientação de:

Professora Doutora Susana Isabel Casal Vicente

e co-orientação de:

Professora Doutora Carla Alexandra Novais Oliveira Silva

Professora Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira

Porto

Novembro, 2014

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Agradecimentos

A realização do presente trabalho não teria sido possível sem todo o apoio recebido, pelo que não posso esquecer o contributo e deixar de agradecer a todos os que me acompanharam neste percurso:

À orientadora, Professora Doutora Susana Isabel Casal Vicente, pela dedicação, acompanhamento permanente, compreensão, disponibilidade, empatia e orientação pedagógica que sempre demonstrou.

À co-orientadora, Professora Doutora Carla Alexandra Novais Oliveira Silva, pelo apoio, dedicação e partilha de conhecimentos e experiências.

À co-orientadora, Professora Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira, pela ajuda, disponibilidade e atenção prestados.

À empresa Ramirez & C^a (Filhos) S. A., em especial à Dra Fátima Barata e restante equipa do Laboratório de Controlo da Qualidade da empresa, pelo acolhimento, receptividade, fornecimento de amostras e colaboração na realização das provas sensoriais e outras análises.

Aos colegas dos laboratórios de Bromatologia e Hidrologia, e de Microbiologia, pela troca de ideias, espírito de entreatajuda e, acima de tudo, pelo companheirismo demonstrado nesta jornada.

À minha família e amigos, por todo o apoio, motivação e compreensão em todos os momentos.

A todos o meu sincero Obrigado,
Por tudo o que me ofereceram.

Resumo

O consumo de peixe tem recebido cada vez mais atenção por parte do público consumidor, que procura hábitos de alimentação saudáveis. Contudo, devido à sua componente físico-química e microbiológica, é um produto naturalmente suscetível a uma rápida degradação após captura. O enlatamento é um método de conservação de peixe com elevado reconhecimento e valorização tanto por parte da indústria alimentar como dos consumidores. A avaliação do prazo de validade dos produtos alimentares é uma prática obrigatória, não sendo contudo usual defini-la após abertura da embalagem. O presente trabalho teve como principal objetivo definir o prazo de validade de conservas de atum e sardinha após abertura, quando armazenadas no frio (4°C) durante um período de sete dias. Foram avaliados sete produtos comerciais diferentes, entre conservas de atum e sardinha.

A avaliação da estabilidade microbiológica, sensorial, física e química das conservas ao longo de sete dias revelou que nem todos os produtos apresentaram a mesma estabilidade a 4°C. Para o atum ao natural e atum com salada russa e maionese verifica-se a necessidade de consumo no próprio dia de abertura. No caso do atum e sardinha em óleo vegetal pode ser consumido até um dia após abertura, ou, até 2 dias na sardinha ao natural. O atum com milho e feijão vermelho e a sardinha em molho de tomate mantiveram-se estáveis até um máximo de 3 dias. Assim, verificou-se que, mais do que o tipo de peixe, neste caso atum em posta ou sardinha com pele, o tipo de molho influencia de forma determinante o tempo de preservação após abertura.

De entre as análises realizadas, a análise sensorial foi preponderante na determinação do prazo de validade, enquanto que a análise microbiológica considerou todas as amostras com qualidade satisfatória no período de tempo avaliado. Apesar das análises físicas (cor) e químicas (humidade, pH, azoto básico volátil total, aminas biogénicas, lípidos totais, ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, vitamina E e compostos fenólicos totais) terem demonstrado alterações com o tempo de armazenamento, algumas com elevada correlação estatística, estas não foram decisivas quando comparadas com a análise sensorial.

Palavras Chave: Controlo de qualidade, Prazo de Validade, Conservas de peixe

Abstract

Fish consumption is receiving increased attention by consumers seeking for health eating habits. However, due to its physicochemical and microbiological characteristics, fish is naturally susceptible to rapid degradation after capture. Fish canning is a preserving method with high recognition and appreciation by both the food industry and consumers. Shelf life assessment of food products is a mandatory practice, although it is not usually defined after opening. This study aimed to determine the shelf life of canned tuna and sardines after opening, under refrigeration (4°C). A total of seven commercial products were evaluated, including canned tuna and sardine.

Base on the evaluation of microbiological, sensorial, physical and chemical stability over a period of seven days under refrigeration, it was possible to demonstrate that not all products had the same stability at 4°C. Natural tuna in brine and tuna with potato salad and mayonnaise should be consumed on the opening day. Tuna and sardines in vegetable oil can be consumed up to 1 day after opening, while sardines in brine can be preserved for two days. For tuna with corn and red beans salad, and sardines in tomato sauce, both products were stable up to 3 days. Therefore, it was verified that, more than the fish type (in this case tuna or whole sardines), the type of sauce decisively influences the preservation time after opening.

Among the analysis performed, sensory evaluation was determinant in the determination of the shelf life, while microbiological analyses classified all samples with satisfactory quality in the period of time evaluated. Although several physical (color) and chemical (moisture, pH, total volatile amines, biogenic amines, lipid content, long-chain polyunsaturated fatty acids, reactive substances to thiobarbituric acid and vitamin E) parameters demonstrated changes over storage time, some with high statistical correlation, these were not decisive when compared with sensorial analysis.

Key words: Quality control, Shelf Life, Canned fish

Índice Geral

Introdução Geral	1
Parte Teórica	5
Capítulo 1 Avaliação do Prazo de Validade dos Alimentos	7
1.1 Prazo de Validade	7
1.1.1 Definição de Prazo de Validade	8
1.1.2 Enquadramento Legislativo	9
1.1.3 Prazo de Validade e o Público Consumidor.....	9
1.1.4 Fatores que afetam o Prazo de Validade.....	11
1.1.4.1 <i>Características dos Alimentos</i>	12
1.1.4.2 <i>Condições de Processamento, Distribuição e Armazenamento</i>	17
1.1.4.3 <i>Propriedades da Embalagem</i>	18
1.1.4.4 <i>Práticas dos Consumidores</i>	19
1.1.5 Extensão do Prazo de Validade	19
1.2 Estudo do Prazo de Validade.....	20
1.2.1 Principais Métodos de Estudo	22
1.2.1.1 <i>Métodos Diretos</i>	22
1.2.1.2 <i>Métodos Indiretos</i>	23
Capítulo 2 O Peixe: Caracterização, Deterioração e Conservação	26
2.1 Consumo de Peixe e seus Benefícios.....	26
2.2 Principais Reações de Deterioração	27
2.2.1 Alterações Autolíticas e Oxidação Lipídica	27
2.2.2 Alterações Microbiológicas.....	28
2.2.3 Alterações Sensoriais.....	29
2.3 Principais Métodos de Conservação	29
2.4 Conservas de Peixe.....	31
2.4.1 Processo de Transformação em Conserva.....	32
2.4.1.1 <i>Receção da Matéria-Prima e Armazenamento</i>	32
2.4.1.2 <i>Pré-Tratamento da Matéria-Prima</i>	33
2.4.1.3 <i>Enlatamento</i>	34
2.4.1.4 <i>Cozedura</i>	34
2.4.1.5 <i>Cravação</i>	35
2.4.1.6 <i>Esterilização</i>	35
2.4.1.7 <i>Embalagem e Expedição</i>	38
2.5 Principais Fatores Associados à Deterioração de Conservas de Peixe.....	39
2.5.1 Deterioração Físico-Química	39
2.5.2 Deterioração Microbiológica	40
2.5.2.1 <i>Principais microrganismos deterioradores</i>	43
Capítulo 3 Métodos para a Avaliação do Prazo de Validade	47
3.1 Análise Microbiológica	47
3.1.1 Importância da Análise Microbiológica	47
3.1.2 Métodos Microbiológicos	48
3.2 Análise Física	51
3.3 Análise Química.....	52
3.3.1 Potencial Hidrogeniónico (pH) e Acidez Titulável	52
3.3.2 Azoto Básico Volátil Total (ABVT) e Trimetilamina (TMA)	53
3.3.3 Aminas Biogénicas.....	55
3.3.4 Degradação Lipídica	57
3.4 Análise Sensorial	58

3.4.1 Métodos Sensoriais.....	59
3.4.1.1 Métodos baseados na Qualidade	60
3.4.1.2 Metodologia do Limite de Aceitabilidade.....	62
3.4.1.3 Metodologia de “Ponto de Corte”	62
3.4.1.4 Análise de Sobrevivência	63
3.4.1.5 Metodologia Complementar - “Nariz Eletrônico”	65
Capítulo 4 - Contextualização do Tema e Objetivos do Trabalho.....	67
Parte Experimental.....	69
Capítulo 5 - Caracterização dos Produtos Avaliados.....	71
5.1 Conservas de Atum	71
5.2 Conservas de Sardinha	71
Capítulo 6 - Avaliação da Estabilidade das Amostras de Conservas após Abertura.....	73
6.1 Avaliação da Estabilidade Microbiológica	73
6.1.1 Amostragem.....	73
6.1.2 Parâmetros Microbiológicos Avaliados.....	75
6.2 Avaliação da Estabilidade Física, Química e Sensorial.....	76
6.2.1 Amostragem.....	77
6.2.2 Parâmetros Sensoriais Avaliados.....	78
6.2.3 Parâmetros Físicos Avaliados.....	80
6.2.3.1 Cor	80
6.2.3 Parâmetros Químicos Avaliados	80
6.2.3.1 Potencial Hidrogeniônico (pH)	80
6.2.3.2 Teor de Humidade.....	80
6.2.3.3 Azoto Básico Volátil Total (ABVT).....	81
6.2.3.4 Aminas Biogénicas.....	81
6.2.3.5 Ácidos Gordos e Vitamina E.....	84
6.2.3.6 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	88
6.2.3.7 Compostos Fenólicos Totais.....	88
6.3 Análise Estatística	89
Capítulo 7 - Resultados e Discussão.....	90
7.1 Avaliação da Estabilidade Microbiológica	90
7.2 Avaliação da Estabilidade Física, Química e Sensorial.....	92
7.2.1 Atum ao natural (AN)	92
7.2.2 Atum em óleo vegetal (AO)	102
7.2.3 Atum com milho e feijão vermelho (AV)	111
7.2.4 Atum com salada russa e maionese (AM)	119
7.2.5 Sardinha ao natural (SN)	127
7.2.6 Sardinha em óleo vegetal (SO)	137
7.2.7 Sardinha em molho de tomate (ST)	145
7.3 Discussão integrada	153
Conclusão.....	159
Bibliografia	161

Índice de Figuras

Figura 1.1 Prazo de Validade "visto" como o tempo até à exposição de prateleira do produto "apodrecido"	7
Figura 1.1 Metodologia para o desenvolvimento de modelos de prazo de validade como resposta ao consumidor	10
Figura 1.3 "Comportamento" da qualidade dos alimentos em relação ao tempo de armazenamento em função da abertura da embalagem e valores relevantes do prazo de validade primário e secundário	11
Figura 1.4 Fatores intrínsecos (a verde) e extrínsecos (a vermelho) que influenciam o prazo de validade dos produtos alimentares.....	12
Figura 1.5 Efeito da contaminação microbiana inicial no prazo de validade dos alimentos	15
Figura 1.6 Número de artigos publicados por ano relativos ao estudo do Prazo de Validade em alimentos, entre 2002 e 2011.....	20
Figura 2.1 Formas mais comuns de comercialização do pescado a nível mundial.....	30
Figura 2.2 Enlatamento Manual de Sardinha.....	34
Figura 2.3 Etapas da cravação na formação de uma costura dupla: (a) fase de assentamento e compressão, (b) fase de enrolamento e (c) fase de aperto.....	36
Figura 2.4 Curvas típicas de sobrevivência de esporos bacterianos, em que (a) Curva de Sobrevivência e (b) Curva Valor D.....	37
Figura 2.5 Diagramas e fotografias de latas sem defeitos (a) e com defeitos de cravação (b e c), em que a) Lata com "costura" normal; b) Lata com "costura" solta; c) Lata com "costura" falsa.....	42
Figura 3.1 Reação do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) com malondialdeído (MDA).....	58
Figura 3.2 Diagrama esquemático relativo às medições de um sistema de Nariz Eletrónico baseado em sensores de microbalança de cristal de quartzo.....	66
Figura 5.1 Atum: espécie <i>Katsuwonus pelamis</i> ("Skipjack").....	71
Figura 5.2 Sardinha: espécie <i>Sardina pilchardus</i>	71
Figura 6.1 Esquema que sintetiza todos os parâmetros microbiológicos, sensoriais, físicos e químicos avaliados no âmbito do presente trabalho.....	74
Figura 6.2 Recipiente de plástico contendo a amostra para análise sensorial, física e química.....	78
Figura 6.3 Exemplo de uma amostra moída com o auxílio de uma tritadora para posterior análise química.....	78
Figura 6.4 Exemplo de uma cromatograma obtido com uma amostra de sardinha em molho de tomate para quantificação das aminas biogénicas por HPLC e deteção por fluorescência.....	84
Figura 6.5 Exemplo de uma cromatograma obtido com uma amostra de sardinha ao natural para quantificação dos ácidos gordos por GC com deteção por ionização em chama (FID).....	86

Figura 6.6 Exemplo de uma cromatograma obtido com uma amostra de sardinha em óleo vegetal para quantificação da vitamina E por HPLC e detecção por fluorescência.....87

Figura 7.1 Alteração da cor na parte exterior das amostras de Atum Natural (AN) no momento da abertura **(a)**, após 24 horas **(b)** e ao fim de 7 dias **(c)**.....94

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 Condições mínimas de crescimento para alguns microrganismos.....	16
Tabela 1.2 Etapas realizadas no método direto para a determinação do Prazo de Validade de diferentes alimentos.....	23
Tabela 2.1 Compostos resultantes da deterioração microbiana em peixe fresco.....	29
Tabela 2.2 Fatores responsáveis pela deterioração microbiológica de alimentos enlatados	41
Tabela 2.3 Principais microrganismos e respectivas manifestações de deterioração em produtos enlatados ácidos e de baixa acidez.....	43
Tabela 3.1 Exemplo de uma matriz utilizada para a análise dos dados, através da análise de sobrevivência e do tipo de censura, onde “Sim” e “Não” significa que o consumidor aceitou e rejeitou a amostra, respetivamente.....	65
Tabela 5.1 Composição, Peso Líquido/Peso Escorrido e Prazo de Validade das conservas de atum e sardinha avaliadas, e respetivos códigos de amostragem atribuídos	72
Tabela 6.1 Parâmetros microbiológicos pesquisados e condições experimentais utilizadas	76
Tabela 6.2 Atributos sensoriais avaliados nas diferentes amostras de conservas.....	79
Tabela 7.1 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do atum ao natural (AN), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	93
Tabela 7.2 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do molho das amostras de atum ao natural (AN), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	96
Tabela 7.3 Resultados obtidos nos parâmetros químicos avaliados para as amostras de atum ao natural (AN), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	98
Tabela 7.4 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do atum em óleo vegetal (AO), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	103
Tabela 7.5 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do molho das amostras de atum em óleo vegetal (AO), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	105
Tabela 7.6 Resultados obtidos nos parâmetros químicos avaliados para as amostras de atum em óleo vegetal (AO), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	107
Tabela 7.7 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do atum com milho e feijão vermelho (AV), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	112
Tabela 7.8 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial dos vegetais das amostras de atum com milho e feijão vermelho (AV), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	114

Tabela 7.9 Resultados obtidos nos parâmetros químicos avaliados para as amostras de atum com milho e feijão vermelho (AV), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	116
Tabela 7.10 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do atum com salada russa e maionese (AM), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio de 3 amostras \pm desvio padrão).....	120
Tabela 7.11 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial dos vegetais das amostras de atum com salada russa e maionese (AM), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	121
Tabela 7.12 Resultados obtidos nos parâmetros químicos avaliados para as amostras de atum com salada russa e maionese (AM), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	123
Tabela 7.13 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial das sardinhas ao natural (SN), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	128
Tabela 7.14 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do molho das amostras de sardinha ao natural (SN), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	131
Tabela 7.15 Resultados obtidos nos parâmetros químicos avaliados para as amostras de sardinha ao natural (SN), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	132
Tabela 7.16 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial das sardinhas em óleo vegetal (SO), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	138
Tabela 7.17 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do molho das amostras de sardinha em óleo vegetal (SO), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	140
Tabela 7.18 Resultados obtidos nos parâmetros químicos avaliados para as amostras de sardinha ao natural (SO), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	142
Tabela 7.19 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial das sardinhas em molho de tomate (ST), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	146
Tabela 7.20 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do molho das amostras de sardinha em molho de tomate (ST), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	148
Tabela 7.21 Concentração de aminas biogénicas (mg/kg amostra) presentes nas amostras de sardinha em molho de tomate (ST), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão).....	149
Tabela 7.22 Dia, após abertura, em que foi verificada uma alteração na estabilidade microbiológica, física, sensorial ou química, para os diferentes produtos avaliados.....	154

Abreviaturas

a* – Escala cromática entre o verde e o vermelho
ABTV – Azoto Básico Volátil Total
AG – Ácido gálico
ATP – Adenosina trifosfato
a_w – Atividade da água
b* - Escala cromática entre o azul e o amarelo
C*_{ab} – Chroma
CE – Eletroforese capilar
CIE – Commission Internationale de L'éclairage
DHA – Ácido docosahexaenóico
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DPA – Ácido docosapentaenóico
Eh – Potencial oxidação-redução
EPA – Ácido eicosapentaenóico
ELISA – Técnica de imunoabsorção enzimática
FAO – Food and Agriculture Organization
FDA – Food and Drug Administration
FSAI – Food Safety Authority of Ireland
GC – Cromatografia gasosa
h_{ab} – Ângulo hue
HACCP – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo
HPA – Health Protection Agency
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
IFT – Institute of Food Technologists
INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
L* - Luminosidade
LC-PUFAs – Ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa
MIQ – Método de Índice de Qualidade
NSWFA – New South Wales Food Authority
NZFSA – New Zealand Food Safety Authority
OTMA – Óxido de trimetilamina
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PT – Portugal
PUFAs – Ácidos gordos polinsaturados
RNA – Ácido ribonucleico
TBA – Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TLC – Cromatografia de camada fina
TMA – Trimetilamina
UFC – Unidades formadoras de colónias
USA – Estados Unidos da América
WHO – World Health Organization
ΔE - Diferença total de cor

Introdução Geral

Nos últimos anos têm ocorrido profundas alterações no sector alimentar, acompanhando as exigências demonstradas pelos consumidores, relacionadas maioritariamente com a garantia da segurança e qualidade alimentar dos produtos adquiridos, em paralelo com a sua facilidade de preparação. De facto, a indústria alimentar tem feito um grande esforço no sentido de disponibilizar no mercado produtos que correspondam aos mais altos padrões de qualidade e ao mesmo tempo seguros, de forma a proteger a saúde do consumidor, bem como fornecer formas de consumo cada vez mais práticas (Kilcast e Subramaniam, 2000; FAO/WHO, 2003).

As organizações mundiais de saúde são unânimes ao aconselhar o consumo regular de peixe como parte integrante da dieta. É consensual que o peixe é um alimento muito nutritivo e de fácil digestão, possui nutrientes essenciais para a promoção da saúde e prevenção de determinados tipos de doença, nomeadamente as cardiovasculares (FAO/WHO, 2010). No entanto, para que o consumidor possa usufruir de todos os benefícios inerentes a este alimento, o mesmo tem de se manter seguro e com qualidade, necessitando de um armazenamento apropriado para que não se verifique a sua degradação. No peixe, as reações de deterioração mais importantes estão relacionadas com alterações autolíticas, oxidação lipídica, alterações microbiológicas e sensoriais, pelo que é comum aplicar diversas técnicas de conservação, com o objetivo de preservar as suas qualidades (Sivertsvilk *et al.*, 2002; FAO, 2014).

Um dos métodos de conservação do peixe com maior reconhecimento e bastante valorizado por ser economicamente acessível e pronto a comer, é o enlatamento. Tal como com todos os produtos alimentares, também nos enlatados de peixe é definido o seu prazo de validade. Apesar da degradação da qualidade dos enlatados ser em geral um processo lento, traduzido em prazos de validade usualmente bastante extensos, as conservas estão sujeitas a fatores que originam a sua degradação e que são de natureza físico-química ou microbiológica (Ray, 2004). As técnicas mais recorrentes para a avaliação do prazo de validade de alimentos incluem métodos microbiológicos, físico-químicos e sensoriais.

Uma questão que se coloca mais recentemente é o prazo de validade após abertura da embalagem. Na verdade, poderá não ocorrer o consumo de todo o conteúdo de uma lata numa refeição e importa definir e informar o consumidor sobre qual a forma adequada de preservar o produto e durante quanto tempo, de forma a garantir a manutenção máxima da sua qualidade e segurança. Assim, a temática do prazo de validade revela-se bastante pertinente, sendo o tema de estudo deste trabalho, recaindo mais especificamente na avaliação da estabilidade de conservas de peixe após abertura.

Parte Teórica

Capítulo 1

Avaliação do Prazo de Validade dos Alimentos

A qualidade da maioria dos produtos alimentares é um estado dinâmico, que diminui gradualmente após a produção. Assim, é necessário definir em cada caso o tempo que decorre entre a produção até à inaceitabilidade, conhecido por “prazo de validade, tempo de prateleira ou tempo útil” (Alpuche-Solís e Paredes-López, 2001).

1.1 Prazo de Validade

Antigamente a definição do prazo de validade era um processo simplesmente observacional, decorrendo até ao estado de produto “apodrecido” (Figura 1.1). Atualmente, o prazo de validade é descrito como o período de tempo durante o qual o produto alimentar permanece seguro e com qualidade, em conformidade com as declarações mencionadas no rótulo, quando armazenado nas condições aconselhadas pelo produtor (Alpuche-Solís e Paredes-López, 2001; Robertson, 2010).



Figura 1.1 Prazo de Validade "visto" como o tempo até à exposição de prateleira do produto "apodrecido" (adaptado de Robertson, 2010)

A definição do prazo de validade é obrigatória para cada produto (Regulamento (UE) nº1169/2011, de 25 de Outubro de 2011) e, naturalmente, os fabricantes tentam aumentar o prazo de validade ao máximo possível, evitando assim maiores perdas económicas. É vital ter em consideração todas as etapas da cadeia alimentar a que o produto é submetido, bem como os principais fatores que afetam a deterioração dos diferentes alimentos, de forma a evitar que o produto final seja exposto ao público consumidor com um prazo de validade inadequado, comercializando um produto com menor qualidade e potencialmente menos seguro. Desta forma, é imprescindível a definição do prazo de validade dos diferentes produtos alimentares o mais próximo possível da realidade (Robertson, 2000 e 2010; Alpuche-Solís e Paredes-López, 2001; Nicoli, 2012; Manzocco, 2012).

1.1.1 Definição de Prazo de Validade

Nas últimas décadas, têm sido propostas várias definições de prazo de validade e o seu significado tem sido sujeito a algumas variações interessantes que refletem a evolução social e económica.

Em 1974, o prazo de validade era definido pelo *Institute of Food Technologists (IFT)* nos Estados Unidos da América (Robertson, 2010) como o “*período entre o fabrico e a venda a retalho de um produto alimentar, durante o qual o produto se encontra num estado de qualidade satisfatória em termos de valor nutricional, sabor, textura e aparência*”. Já em 1993 e na Europa (Kilcast e Subramaniam, 2000; Robertson, 2010), o *Institute of Food Science and Technology* descreveu o prazo de validade como o “*período de tempo durante o qual o produto alimentar irá: i) permanecer seguro; ii) manter as suas características químicas, sensoriais, físicas, microbiológicas e funcionais e, se for o caso, iii) cumprir com qualquer declaração do rótulo de dados nutricionais, quando armazenados sob as condições recomendadas*”. De facto, verifica-se um desenvolvimento no conceito de prazo de validade ao longo dos anos, no que respeita à “passagem” de uma definição que delimita a importância do tempo de vida dos alimentos desde a produção ao momento de compra, a uma definição mais abrangente, ou seja, que dá ênfase à relação entre o prazo de validade dos produtos e as condições de armazenamento até à posterior preparação e consumo. Para além disso, passa-se de um estado de qualidade satisfatória em termos nutricionais e sensoriais, para um produto seguro e que deverá manter todas as suas características de qualidade. A evolução da definição de prazo de validade é acompanhada por um aumento na perspetiva da totalidade do período de fabricação e consumo do produto alimentar (Robertson, 2000; Nicoli, 2012).

Já para o *Codex Alimentarius* (1969), o prazo de validade de um alimento é definido como “*o período durante o qual um género alimentício mantém a segurança microbiológica, a uma temperatura de armazenamento especificada*”. Acrescenta-se assim a necessidade de serem mantidas as condições definidas como ideais para o seu armazenamento, sendo esta manutenção transversal a toda a cadeia alimentar pós-produção e incluindo o armazenamento em casa do consumidor, abrindo a responsabilidade a todos os intervenientes. Valero *et al.* (2012) descrevem prazo de validade como “*o prazo ou período de armazenamento de um produto até que um elemento, de natureza biológica ou físico-química, específico do mesmo o torne impróprio para uso ou consumo*”.

De uma forma global, o prazo de validade pode ser descrito como o período de armazenamento durante o qual a qualidade permanece adequada para consumo, em

condições apropriadas de temperatura, humidade relativa, luz e outras, sofrendo pequenas mas bem estabelecidas alterações, que são, até certo ponto, aceitáveis pelo fabricante e consumidor, atendendo às exigências legais e de segurança alimentar. Como os mecanismos de perda de qualidade dos alimentos são complexos e os consumidores têm sensibilidades diferentes a essa perda, percebe-se que é difícil estabelecer uma definição universal de prazo de validade (Ceylan, 2007; Saguy e Peleg, 2009; Giménez *et al.*, 2012).

O prazo de validade de um produto começa a partir do momento em que o alimento é preparado ou fabricado, correspondendo ao período de tempo em que este se encontra com qualidade adequada em termos de valor nutricional, sabor, textura e aparência e permanece seguro sob o ponto de vista físico, químico e microbiológico (Manzocco, 2012; Nicoli, 2012).

1.1.2 Enquadramento Legislativo

O Regulamento (CE) n.º 2073/2005, de 15 de Novembro de 2005, descreve como prazo de validade o *“período correspondente ao intervalo de tempo que precede a data limite de consumo dos produtos, ou a data de durabilidade mínima”*. O termo *“Data de durabilidade mínima”* define o prazo de validade de um género alimentício que corresponde à data até à qual este mantém as suas propriedades específicas, quando armazenado de forma adequada. Por sua vez, quando o alimento ultrapassa a sua data de durabilidade mínima não significa, necessariamente, que deixou de ser seguro, mas já não deve ser considerado como um produto de máxima qualidade.

De acordo com o Regulamento (UE) n.º 1169/2011, de 25 de Outubro de 2011, *“no caso de géneros alimentícios microbiologicamente muito perecíveis (...) a data de durabilidade mínima deve ser substituída pela data-limite de consumo”* e é uma das indicações obrigatórias que deve estar presente no rótulo do produto alimentar. Além disso, ainda o mesmo Regulamento define e estabelece em que circunstâncias são mencionadas na rotulagem dos géneros alimentícios a data limite de consumo e a data de durabilidade mínima.

Contudo, nenhuma legislação refere a forma como deverá ser determinada a data mencionada, admitindo-se que a responsabilidade pela sua determinação é do produtor do alimento.

1.1.3 Prazo de Validade e o Público Consumidor

O consumidor pretende obter no ato de compra um produto de qualidade ótima e que preserve as mesmas características durante o período de armazenamento até ao

seu consumo (Manzocco, 2012; Nicoli, 2012). Estas expectativas são uma consequência da exigência de que o alimento deve permanecer seguro e da necessidade de minimizar a ocorrência de alterações indesejáveis (Kilcast e Subramaniam, 2000).

Conforme referido, o prazo de validade tem sido definido de diversas formas, mas em cada definição é enumerado o facto de que o fim do prazo de validade é atingido em correspondência a um nível de qualidade que distingue os produtos ainda aceitáveis para consumo dos que já não estão aceitáveis, designando-se por limite de aceitabilidade. De certa forma, o prazo de validade corresponde ao tempo necessário para atingir o nível de qualidade correspondente ao limite de aceitabilidade. Apesar do seu significado aparentemente intuitivo, o limite de aceitabilidade é um parâmetro difícil de quantificar, sendo assim importante que os produtores identifiquem os limites de aceitabilidade dos seus produtos de acordo com a política da empresa e as metas de qualidade definidas com base em índices de qualidade mensuráveis, com suporte químico, físico, microbiológico e sensorial (Figura 1.2) (Manzocco, 2012; Nicoli, 2012).

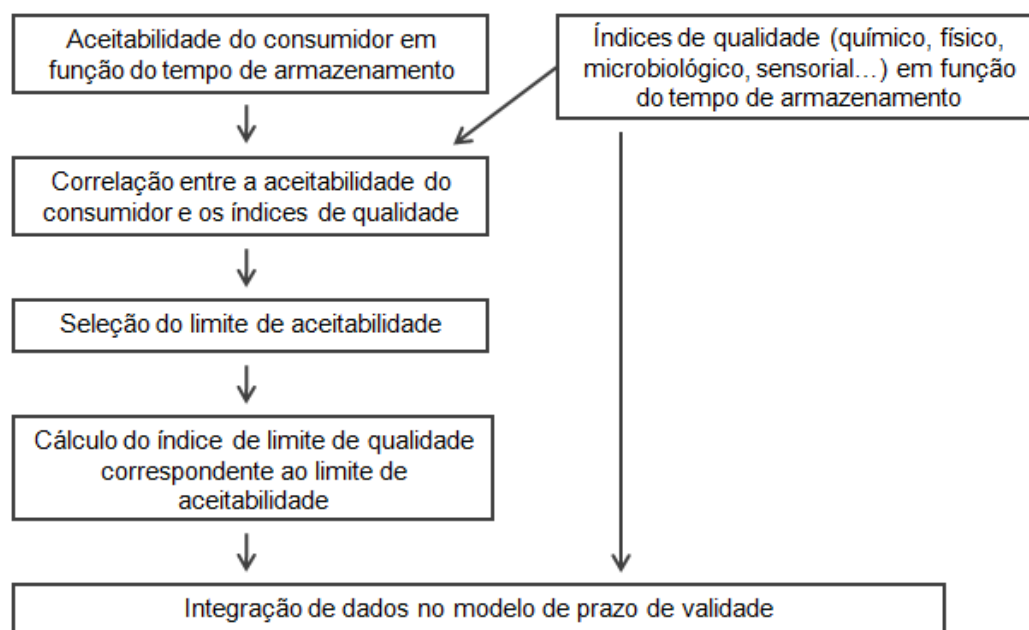


Figura 1.2 Metodologia para o desenvolvimento de modelos de prazo de validade como resposta ao consumidor (adaptado de Manzocco e Lagazio, 2009)

Ainda neste contexto, é importante ter em consideração o período após a abertura da embalagem, também designado como prazo de validade primário. Neste espaço de tempo, o produto alimentar deve manter um nível de qualidade aceitável, uma vez que o “abrir” da embalagem influencia de forma negativa determinadas características dos alimentos, como por exemplo a atividade da água (a_w), e a atividade microbiana, entre outras, devido às mudanças das condições ambientais a que é sujeito (alterações na

composição da atmosfera envolvente). Quando a embalagem do alimento é aberta, a principal consequência, na maioria dos casos, é um declínio acelerado da qualidade do produto em causa, como pode ser observado na Figura 1.3 (Nicoli, 2012), atingindo-se muito mais rapidamente o limite de aceitabilidade. Ao período entre a abertura e o limite de aceitabilidade, este autor denominou prazo de validade primário por oposição ao secundário, que decorre do fabrico até à data definida e indicada na embalagem

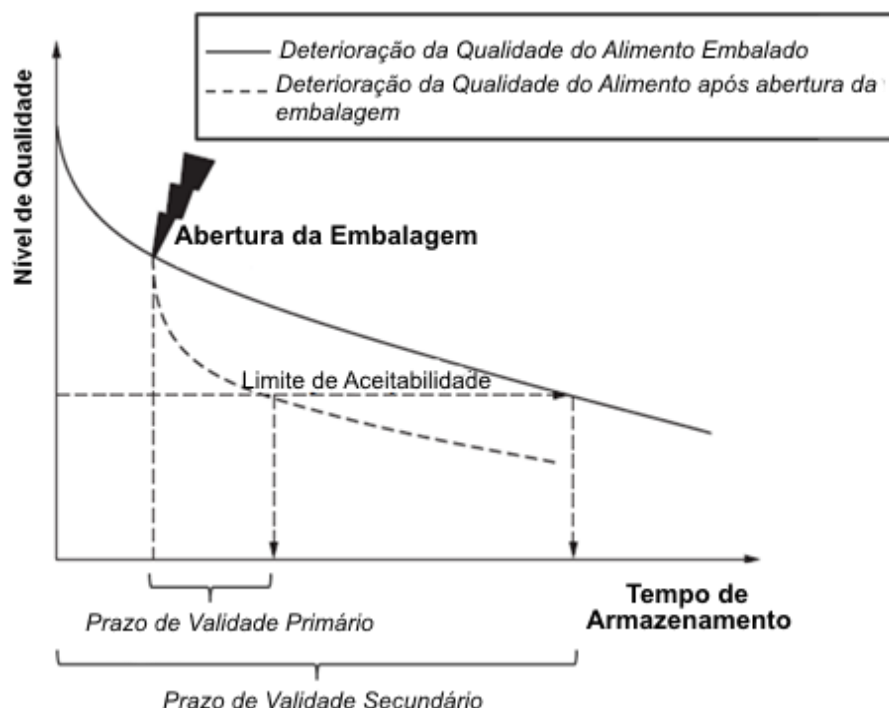


Figura 1.3 "Comportamento" da qualidade dos alimentos em relação ao tempo de armazenamento em função da abertura da embalagem e valores relevantes do prazo de validade primário e secundário (adaptado de Nicoli, 2012)

1.1.4 Fatores que afetam o Prazo de Validade

Os principais fatores responsáveis por variações nas condições que delimitam o prazo de validade dizem respeito a fatores extrínsecos: condições de processamento, distribuição e armazenamento, propriedades da embalagem e práticas dos consumidores, e a fatores intrínsecos: características dos produtos (Figura 1.4) (Robertson, 2000 e 2010; Galić *et al.*, 2009). A interação dos fatores intrínsecos e extrínsecos inibe ou estimula determinados processos/mecanismos que limitam o prazo de validade dos produtos. Assim, é importante um controlo eficaz de todos os fatores que afetam, direta ou indiretamente, o prazo de validade, para garantir a qualidade dos alimentos e prever e controlar o prazo de validade, bem como a segurança dos produtos alimentares (Robertson, 2000 e 2010; Escobedo-Avellaneda *et al.*, 2012).

Seguidamente serão abordados de forma pormenorizada cada um dos referidos fatores, para que seja compreendida a necessidade do conhecimento destes aquando do estudo do prazo de validade.

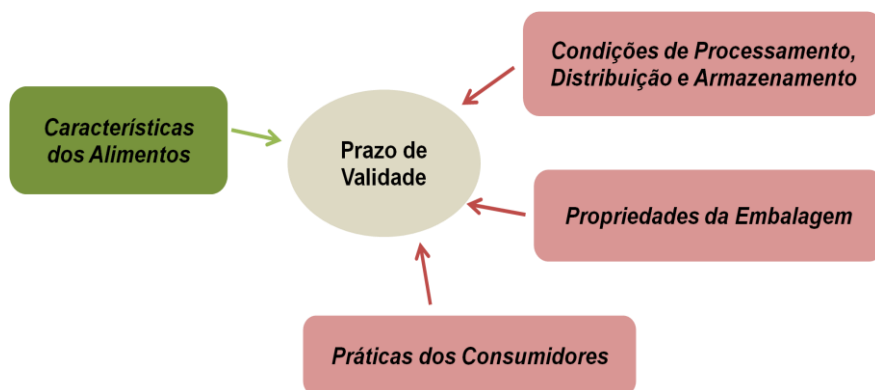


Figura 1.4 Fatores intrínsecos (a verde) e extrínsecos (a vermelho) que influenciam o prazo de validade dos produtos alimentares (adaptado de Galić *et al.*, 2009)

1.1.4.1 Características dos Alimentos

São diversas as características do alimento que afetam o prazo de validade. São exemplos a composição química, atividade de água (a_w), pH e acidez total, oxigénio disponível, enzimas ativas, nível de contaminação microbiana e o tipo e concentração de conservantes utilizados. É de salientar que a a_w desempenha um papel vital no prazo de validade, uma vez que determina, em grande parte, o crescimento microbiano, assim como a taxa de reações químicas e enzimáticas (mudanças no sabor, aroma, cor e perda de nutrientes). Os fatores intrínsecos do alimento podem ser influenciados pela escolha da matéria-prima e a sua qualidade, bem como pela composição do próprio alimento (Kilcast e Subramaniam, 2000; Ceylan, 2007; Robertson, 2010; Escobedo-Avellaneda *et al.*, 2012). É sabido que os alimentos são naturalmente perecíveis e, de acordo com a natureza das alterações que podem ocorrer durante o armazenamento, podem ser divididos em três categorias: perecíveis, semi-perecíveis e não perecíveis, que se traduzem em produtos alimentares com prazo de validade que varia entre muito curto a longo. Os alimentos perecíveis devem ser conservados a temperaturas de refrigeração ou de congelação (0°C a 4°C ou -12°C a -18°C , respetivamente), incluindo-se produtos como o leite, carne, peixe, aves, alimentos minimamente processados e algumas frutas e vegetais frescos. Geralmente, um alimento perecível (devidamente armazenado) tem menos de 14 dias de prazo de validade, na maioria das vezes condicionado pela decomposição bioquímica (senescência/enzimática) ou microbiana (Galić *et al.*, 2009). Por outro lado, os alimentos semi-perecíveis contêm inibidores naturais (alguns queijos, vegetais de raiz e ovos) ou foram sujeitos a um determinado processo de preservação

leve (por exemplo, pasteurização do leite, fumagem de carnes, entre outros), garantindo maior tolerância a condições ambientais de processamento, armazenamento e de distribuição. Contudo, há alimentos que são conservados à temperatura ambiente, os considerados alimentos não perecíveis. Estes alimentos não necessitam de processos de transformação porque possuem naturalmente baixo teor de humidade, não sendo afetados pela ação dos microrganismos. Caso sejam processados, são normalmente estáveis durante um período elevado, incluindo aqui a preservação por esterilização (por exemplo, enlatados), adição de conservantes (por exemplo, bebidas com álcool), formulados com misturas secas (por exemplo, misturas para bolos), ou o seu teor em água é reduzido (alimentos desidratados) (Singh, 2000; Galić *et al.*, 2009; Robertson, 2010). Os principais mecanismos envolvidos na deterioração de alimentos, conforme referido, podem ser de natureza biológica, química e física.

◆ Fatores Biológicos

No que respeita à deterioração por via biológica, a senescência (“envelhecimento”) e a degradação pela ação dos microrganismos são as principais causas que levam à perda de qualidade dos produtos alimentares. Quando os produtos como frutos, vegetais, grãos de cereais ou de origem animal são colhidos ou abatidos, estes são “separados” da sua fonte de nutrientes e água. Por sua vez, as enzimas continuam a consumir as reservas de nutrientes presentes no alimento. Eventualmente, para todos os alimentos, os processos enzimáticos pós-colheita podem levar à degradação da qualidade sensorial, incluindo a perda de cor, sabor, textura e nutrientes (Holmes *et al.*, 1979; Ceylan, 2007; Robertson, 2010).

Por outro lado, os microrganismos e suas toxinas (bactérias e suas toxinas, vírus, parasitas, fungos e micotoxinas) são responsáveis pela perda de qualidade, especialmente nos alimentos mais frescos, sendo este processo por vezes acompanhado pelo desenvolvimento de organismos patogénicos, com implicações na segurança do alimento (Ray e Bhunia, 2008a). Estes já podem estar presentes nos produtos crus ou serem “introduzidos” a partir de fontes externas durante o processamento, armazenamento ou preparação dos alimentos, nomeadamente por condições de higiene inadequadas, contaminação cruzada, assim como o uso de fómites contaminados (Chen *et al.*, 2001; Kusumaningrum *et al.*, 2003; INSA e WHO, 2006).

Os microrganismos presentes nos alimentos podem dividir-se em diferentes grupos de acordo com a sua ação:

- ◆ Os que contribuem benéficamente para o processamento e qualidade de alguns alimentos (ex: queijo, iogurte, carne fermentadas). A introdução destes microrganismos tem o objetivo de prolongar o prazo de validade do alimento,

garantindo que este se mantém seguro e com qualidade ao longo do período de armazenamento, além de apresentarem um papel importante no desenvolvimento das características organoléticas do alimento (Ross *et al.*, 2002). Entre eles estão as bactérias *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus* e os fungos *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* e *Penicillium roqueforti* (Caplice e Fitzgerald, 1999; Ray e Bhunia, 2008b).

- ◆ Os que são responsáveis pela deterioração dos produtos alimentares quando o seu número é elevado (ex: Bolores, Leveduras e bactérias dos géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*) (Ray e Bhunia, 2008c). Para além das alterações químicas e danos físicos, o crescimento e metabolismo microbiano é a principal causa de deterioração dos alimentos, associado, por exemplo, à formação de diferentes compostos responsáveis pelo desenvolvimento de sabores secundários desagradáveis (ex: aminas, sulfuretos, álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos). A degradação por ação dos microrganismos manifesta-se através de alterações nas propriedades sensoriais (ex: cor, odor, sabor e textura) do produto alimentar, tornando-o inaceitável e impróprio para consumo humano (ex: acumulação de gás, aparecimento de colónias, entre outros) (Gram e Dalgaard, 2002; Ray e Bhunia, 2008c).
- ◆ Os patogénicos que colocam em risco a saúde dos consumidores ao estarem associados a doenças de origem alimentar. Entre estes destacam-se aqueles responsáveis por infeções alimentares como a *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella*, *Campylobacter* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*; a toxi-infeções como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*; e a intoxicações como *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus* spp. (Beuchat, 1996; Viegas, 2009).

O crescimento de microrganismos de deterioração é, na maior parte das vezes, acompanhado por alterações sensoriais, nomeadamente o crescimento de fungos (detetado a nível visual), produção de odores e sabores indesejáveis, bem como alterações na textura normalmente pela ação de enzimas produzidas pelos mesmos microrganismos (Kilcast e Subramaniam, 2000).

Por outro lado, o crescimento de um microrganismo específico durante o armazenamento depende, entre outros, da carga microbiana no início do armazenamento, das propriedades físico-químicas da matriz alimentar, do modo de processamento (tempo/temperatura), e do ambiente externo ao alimento (composição do gás circundante e da temperatura de armazenamento). A matéria-prima utilizada na indústria alimentar representa uma fonte potencial de contaminação microbiana, pelo que

este potencial será, posteriormente, afetado pela eficácia das etapas de processamento na eliminação de bactérias nos alimentos (Holmes *et al.*, 1979; Kilcast e Subramaniam, 2000; Ceylan, 2007; Robertson, 2010). Pela observação da Figura 1.5 é possível constatar que para um nível de contaminação inicial mais elevado os microrganismos de deterioração específicos atingem mais rapidamente o nível mínimo de deterioração, daí a necessidade em reduzir o período do prazo de validade em função da carga microbiana inicial (Valero *et al.*, 2012).

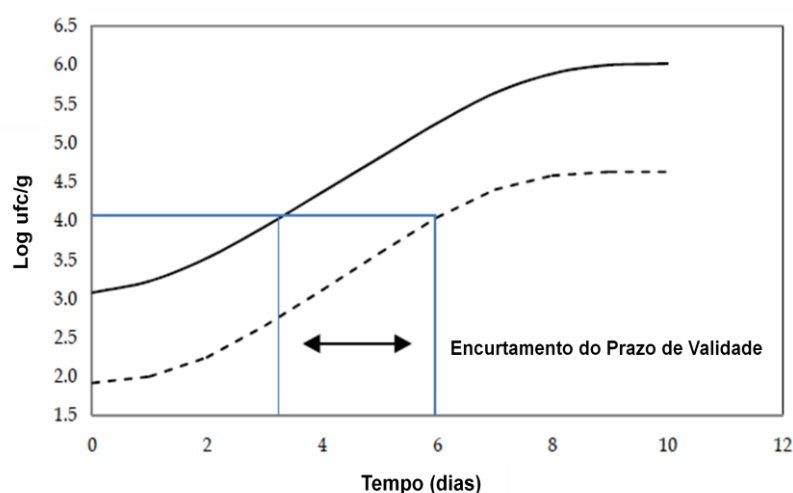


Figura 1.5 Efeito da contaminação microbiana inicial no prazo de validade dos alimentos (adaptado de Valero *et al.*, 2012)

É sabido que os microrganismos têm um intervalo ótimo de pH para o seu crescimento em diferentes alimentos. Os principais fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam o crescimento de alguns microrganismos patogênicos e deteriorativos, bem como as respectivas condições mínimas de crescimento, são enumerados na Tabela 1.1.

As bactérias normalmente apresentam um crescimento mais acentuado entre faixas de pH de 6,0-8,0; as leveduras entre 4,5-6,0; e os bolores entre 3,5-4,0 (Valero *et al.*, 2012). Tal como salientado, a a_w é uma característica fundamental no que respeita à regulação do crescimento microbiano. Por exemplo, as bactérias de Gram negativo são mais sensíveis a alterações na a_w , comparativamente às bactérias de Gram positivo, e a maioria dos organismos patogênicos são inibidos a valores de a_w abaixo de 0,86. Além disso, o valor do potencial oxidação-redução (Eh) no qual os microrganismos crescem determina a sua necessidade ou não de oxigênio, sendo classificados em aeróbios estritos, anaeróbios estritos ou anaeróbios facultativos. Por outro lado, a superfície natural dos alimentos, a conhecida estrutura biológica, oferece proteção à entrada e subsequentes danos provocados por microrganismos. Certas matrizes alimentares também podem apresentar na sua constituição substâncias com propriedades

antimicrobianas (ex: lisozima), que limitam o crescimento de microrganismos específicos (Valero *et al.*, 2012).

Tabela 1.1 Condições mínimas de crescimento para alguns microrganismos (adaptado de Kilcast e Subramaniam, 2000)

Tipo de microrganismo	Condições mínimas de pH	Condições mínimas de a_w	Crescimento anaeróbio ^a	Temperatura mínima (°C) ^b
Patogênicos				
<i>Salmonella</i> spp.	4,0	0,94	Sim	7
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,0 (4,5 para a toxina)	0,83 (0,90 para a toxina)	Sim	6 (10 para a toxina)
<i>Bacillus cereus</i> (psicrótrófico)	4,4	0,91	Sim	< 4
<i>Clostridium botulinum</i>				
Proteolítica A, B, F	4,6	0,93	Sim	10
Não-proteolítica B, E, F	5,0	0,97	Sim	3,3
<i>Listeria monocytogenes</i>	4,3	0,92	Sim	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4,8	0,94	Sim	5
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4,2	0,96	Sim	-2
Deterioradores				
<i>Pseudomonas</i> spp.	5,5	0,97	Não	< 0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4,4	0,94	Sim	2
Bactérias produtoras de ácido láctico	3,8	0,94	Sim	4
<i>Micrococcus</i>	5,6	0,9	Não	4
Leveduras	1-5	0,8	Sim	-5
Fungos	< 2	0,6	Não	< 0

^aSobrevivência sem oxigênio, por exemplo em embalagem a vácuo

^bTemperaturas mínimas de crescimento em condições de pH neutro, a_w alta e sob refrigeração

◆ Fatores Químicos

A deterioração não-microbiana influencia também a perda de qualidade, mas pode não ser necessariamente prejudicial para a saúde dos consumidores, apesar do produto poder não ser considerado dentro do padrão aceitável. Na deterioração química, as reações enzimáticas, a oxidação lipídica, o escurecimento não-enzimático e outras reações químicas acarretam um decaimento na qualidade do produto (Holmes *et al.*, 1979; Kilcast e Subramaniam, 2000; Ceylan, 2007; Robertson, 2010).

Os alimentos que contêm gorduras insaturadas são imprescindíveis para a nutrição humana, mas estas podem ser sujeitas ao ataque do oxigênio por meio de um mecanismo autocatalítico de radicais livres, promovendo a formação de *off-flavours* (compostos aromáticos voláteis percebidos como odor a ranço). O escurecimento não-enzimático é outra reação química envolvida na perda da qualidade e valor nutricional

dos produtos alimentares. A reação ocorre entre os compostos redutores e os aminoácidos ou proteínas, sendo associada frequentemente às chamadas reações de Maillard. É de salientar o facto de em certos alimentos ser desejável o desenvolvimento deste tipo de reação, nomeadamente o escurecimento da crosta do pão. O efeito da temperatura, nível de oxigénio, humidade e luz deve ser conhecido para ter em consideração a taxa de reação, de maneira a que o tempo necessário para alcançar o final do prazo de validade seja determinado. A par destes dados, devem ser correlacionadas as características organoléticas e a análise sensorial para que o índice correto de deterioração seja escolhido (Holmes *et al.*, 1979; Kilcast e Subramaniam, 2000).

É conveniente ainda referir o facto da migração de compostos químicos a partir do material de embalagem contribuir para o decréscimo da qualidade inicial do produto alimentar no decorrer do período após a sua produção até ser consumido (Emblem, 2000; Robertson, 2010). A preocupação com este tipo de contaminação será abordada num dos tópicos seguintes, mais concretamente no tópico relativo às propriedades das embalagens.

◆ Fatores Físicos

No que concerne à deterioração física, as contusões/esmagamento, alterações na textura induzidas pelo ganho ou perda de humidade e pela temperatura incrementam, também, uma diminuição da qualidade dos alimentos. Relativamente à deterioração resultante de contusões/esmagamento, o abuso físico do alimento está intimamente relacionado com as etapas de colheita, processamento e distribuição, demonstrando maior relevo em frutos e verduras, e este abuso leva ao desenvolvimento microbiano e atividade enzimática devido ao aumento de nutrientes disponíveis e, conseqüentemente, à sua decadência. Condições que provocam o ganho ou perda de humidade têm como consequência uma mudança na textura, endurecimento ou amolecimento, consoante as características do alimento. Adicionalmente, é vital o conhecimento da sensibilidade de determinadas reações relacionadas com o grau de variação da temperatura (Holmes *et al.*, 1979; Kilcast e Subramaniam, 2000).

1.1.4.2 Condições de Processamento, Distribuição e Armazenamento

Durante as fases de processamento, distribuição e armazenamento os alimentos estão expostos a uma vasta gama de condições ambientais (por exemplo, temperatura, humidade, oxigénio, luz), que desencadeiam mecanismos de reação, provocando a degradação do produto alimentar. É, por isso, essencial adotar as melhores condições

nestas etapas, com base numa metodologia que garanta a qualidade e abranja o controlo de qualidade, incluindo o sistema HACCP (Singh, 2000; Rumpf, 2008; Galić *et al.*, 2009; Robertson, 2010).

O processamento envolve a etapa da seleção de matérias-primas adequadas para que seja garantida a integridade do produto final durante o seu período de prazo de validade. Os fabricantes têm como finalidade determinar o prazo de validade adequado para os seus produtos, com base num estudo que pondera todas as fases da cadeia de produção. Os distribuidores têm como função o transporte do produto alimentar do fabricante até ao retalhista de forma segura, isto é, cumprindo as regras básicas de transporte, como por exemplo manter a temperatura correta, evitar que a embalagem seja danificada e a contaminação dos alimentos a partir de outros bens transportados no veículo. Por sua vez, os retalhistas armazenam e manuseiam o produto antes de ser exposto para o consumidor, daí a necessidade em submeter o produto a um armazenamento adequado durante esse período de tempo, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (Kilcast e Subramaniam, 2000; Galić *et al.*, 2009; Robertson, 2010; Singh *et al.*, 2011).

1.1.4.3 Propriedades da Embalagem

A embalagem desempenha um papel fundamental na indústria alimentar, pois além de ter múltiplas funções, permite, geralmente, um acréscimo do prazo de validade do produto, garantindo a qualidade, segurança e integridade do alimento embalado. Na verdade, esta tem como foco a “proteção” dos produtos contra os efeitos responsáveis pela deterioração, isto é, proteger o seu conteúdo a partir do exterior de efeitos ambientais; conter o produto; ser o elo de comunicação entre os produtores/fornecedores e o público consumidor; e permitir o fornecimento dos produtos aos consumidores com a facilidade de uso e conveniência (Robertson, 2000; Singh *et al.*, 2011; Koutsimanis *et al.*, 2012).

A eficiência da embalagem sob o ponto de vista de produção ou comercial (manuseamento, transporte e armazenamento) deve ter o mínimo impacto ambiental adverso e evitar a possibilidade de transferir contaminantes indesejáveis para o alimento. Os parâmetros englobados nas características da embalagem (material da embalagem; a composição do gás: oxigénio, dióxido de carbono, gases inertes, etileno, entre outros; a humidade relativa; a pressão ou tensões mecânicas; permissividade à luz e temperatura de conservação) podem ter um efeito significativo em muitos fatores extrínsecos e, indiretamente, sobre as taxas de reações responsáveis pela deterioração. Por conseguinte, há diversos fatores que devem ser tidos em conta aquando da escolha da

embalagem para um determinado produto, como as características do alimento e da própria embalagem, as condições e tipo de processamento e o prazo de validade. Por exemplo, as embalagens metálicas e de vidro são impermeáveis à permuta de gases, odores e vapor de água, ao contrário do material de embalagem à base de papel que pode ser considerado permeável. O plástico, permite diferentes graus de proteção, consoante a natureza dos polímeros utilizados no seu fabrico (Emblem, 2000; Kilcast e Subramaniam, 2000; Robertson, 2010; Koutsimanis *et al.*, 2012).

1.1.4.4 Práticas dos Consumidores

O elo final da cadeia alimentar também é considerado um fator determinante no prazo de validade dos alimentos. Os consumidores devem fazer uma reflexão prévia dos produtos alimentares que pretendem comprar, de forma a que, consoante o tipo de alimento e respetivo nível de processamento, as condições de conservação dos mesmos não sejam “quebradas” no período entre a sua aquisição no supermercado e o seu armazenamento em casa. Em concreto para produtos refrigerados e congelados a cadeia de frio deve continuar até casa do consumidor. Para além disso, deve cumprir todas as recomendações dos alimentos não sujeitos a frio, nomeadamente luz, humidade, odores, entre outros (Ovca e Jevšnik, 2009).

1.1.5 Extensão do Prazo de Validade

Nos últimos anos, a ciência e a tecnologia têm vindo a compreender e a desenvolver os princípios subjacentes às técnicas de preservação de alimentos. O prazo de validade dos produtos alimentares pode ser prolongado através do recurso a determinados métodos de processamento e da utilização de diferentes tipos de embalagens. De facto, os produtores deparam-se com uma crescente gama de métodos de processamento e embalagens destinados a melhorar a qualidade do prazo de validade dos produtos (Gould, 1996; Kilcast e Subramaniam, 2000; Rumpf, 2008).

São diversos os tipos de processamento a que os alimentos podem ser submetidos com a finalidade de prolongar o seu prazo de validade, tais como: uso de temperatura (conservação pelo calor e frio), redução da atividade da água (concentração e secagem, adição de humectantes) e adição de aditivos (conservação química). No caso de produtos alimentares conservados à temperatura ambiente e com um longo prazo de validade, como é o caso das conservas, é necessário a utilização de tratamentos severos (esterilização) aquando do processamento. Também é de salientar o crescente interesse da indústria alimentar em colocar no mercado alimentos ditos minimamente processados. Para isso, recorrem a técnicas de processamento moderado (tratamentos mínimos que

envolvem pouco calor, micro-ondas, irradiação, alta-pressão, etc), em que os produtos gerados são seguros e de valor acrescentado, mas que necessitam usualmente de um processo de preservação complementar, como o armazenamento refrigerado e uma embalagem adequada. A par dos métodos de processamento utilizados, é crucial o recurso a novas técnicas e materiais de embalagem, nomeadamente embalagens a vácuo (ausência de atmosfera), com atmosfera modificada (combinações específicas de diferentes gases, como O₂, CO₂ e N₂), com filmes de permeabilidade controlada, e com reguladores de humidade e temperatura. É sabido que uma das premissas da embalagem alimentar é evitar a interação com o produto contido. Contudo, o aparecimento de “embalagens ativas” na indústria alimentar confere-lhes uma interação positiva com o alimento e o meio ambiente (Holmes *et al.*, 1979; Emblem, 2000; Kilcast e Subramaniam, 2000).

1.2 Estudo do Prazo de Validade

A indústria alimentar tem-se desenvolvido e ampliado, a nível nacional e mundial, oferecendo ao mercado uma vasta gama de produtos, práticos, seguros e com qualidade. Como um número crescente de novos alimentos disputam espaço nas prateleiras dos supermercados, as palavras "velocidade e inovação" tornaram para as empresas (Sewald e De Vries, s.d.; Robertson, 2000; McMahon, 2012).

Na génese deste facto, a estimativa do prazo de validade dos produtos alimentares tornou-se cada vez mais importante nos últimos anos e como representado na Figura 1.6, verifica-se um acréscimo no número de artigos publicados em revistas científicas internacionais relacionados com o estudo do prazo de validade, no período decorrente entre 2002 e 2011 (Giménez *et al.*, 2012).

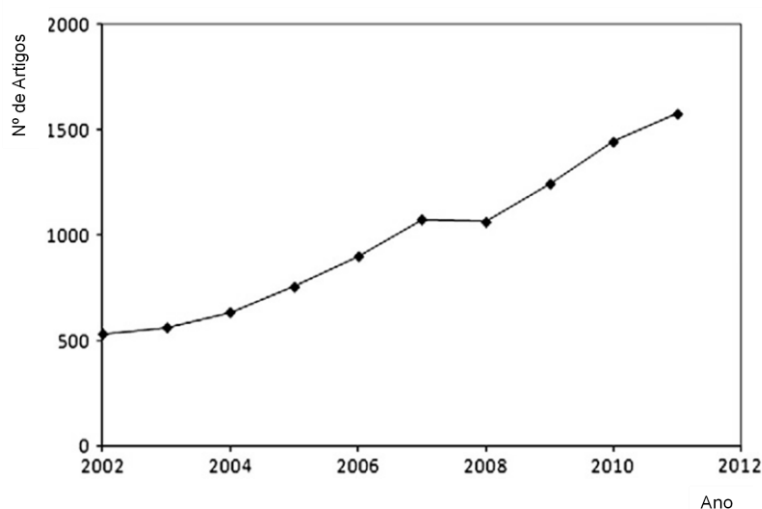


Figura 1.6 Número de artigos publicados por ano relativos ao estudo do Prazo de Validade em alimentos, entre 2002 e 2011 (adaptado de Giménez *et al.*, 2012)

O estudo preciso do prazo de validade consiste na determinação objetiva e metódica do período de conservação expectável para um determinado alimento. Deve ser feito um estudo separado para cada tipo de alimento e não deve ser aplicado como resolução de um problema, mas sim como um complemento de forma a evitar problemas e garantir que o produto em comercialização mantém os atributos de qualidade característicos (reivindicações nutricionais, microbiológicas e organoléticas). A verificação do mesmo deve ser contínua e é necessário reaplicar o seu estudo em diferentes situações, como por exemplo, aquando de mudanças nas condições de processamento ou armazenamento, ingredientes, entre outros. A avaliação do prazo de validade requer a definição exata de critérios para o fim da vida do produto (Rybka-Rodgers, 2001; Corradini e Peleg, 2007; Subramaniam, 2010; Nicoli, 2012).

A reprodutibilidade e a confiança no prazo de validade estabelecido para um determinado produto alimentar é dependente dos fatores intrínsecos (qualidade microbiológica, pH, a_w , potencial de oxidação-redução, agentes antimicrobianos, entre outros) e extrínsecos (embalagem, condições de processamento e armazenamento, e práticas dos consumidores) desse mesmo produto. O prazo de validade não é um valor absoluto, que termina num tempo e data exata, sendo mais correto considerar que há uma distribuição destes parâmetros em torno de um prazo de validade médio. Por sua vez, o prazo de validade de um alimento pode não ser 100% reprodutível em diferentes circunstâncias. Assim, é importante a aplicação de uma margem temporal de segurança ao prazo de validade de um dado produto, no sentido da redução da sua durabilidade, para permitir ao produtor ter em atenção qualquer variação expectável, ou não, das condições de produção, distribuição, armazenamento e posteriormente de consumo (Taoukis e Labuza, 1989; FSAI, 2005; NZFSA, 2005).

A distinção entre avaliação da estabilidade e estudos do prazo de validade é de primordial importância. Nos estudos de estabilidade, a evolução ou degradação de uma característica do produto é avaliada ao longo do tempo, isto é, a estimativa da taxa de decréscimo da qualidade alimentar é uma preocupação primária. Por sua vez, os estudos do prazo de validade consistem numa estimativa/previsão do tempo de “falha” dos alimentos. Na prática, os estudos da estabilidade são, maioritariamente, realizados como um passo preliminar no estudo do prazo de validade. Porém, os testes de estabilidade podem substituir o estudo do prazo de validade, quando a finalidade consiste na identificação de soluções tecnológicas dirigidas para o prolongamento e estabilidade do produto alimentar (Guillet e Rodrigue, 2010; Nicoli, 2012).

1.2.1 Principais Métodos de Estudo

Nos últimos anos, foram relatados diversos procedimentos para o estabelecimento do prazo de validade, principalmente com base na detecção de alterações microbianas, assim como as alterações físico-químicas e sensoriais (Valero *et al.*, 2012). O estudo do prazo de validade deverá ter por base protocolos pré-definidos, onde são descritas, por exemplo, as análises a realizar, o planeamento do estudo (número de amostras, as condições de estudo, entre outros) e os resultados esperados. As informações preliminares são muito úteis para aperfeiçoar o projeto experimental e podem ser obtidas a partir de várias fontes, nomeadamente dados históricos de processamento e as condições de armazenamento, as características dos alimentos, dados históricos microbiológicos, entre outros, ou através de estudos já publicados e, neste caso, aplicados a produtos semelhantes ao alimento em estudo (NZFSA, 2005; Rumpf, 2008).

É importante ter em consideração que a Legislação Internacional atual não prevê a aplicação de protocolos padrão de forma a estabelecer o prazo de validade dos produtos alimentares. Em contrapartida, têm sido publicadas várias Diretrizes Nacionais e Internacionais para este fim, que sugerem diferentes métodos e protocolos de análises, focados principalmente em alimentos prontos a comer (FSAI, 2005; NZFSA, 2005; Valero *et al.*, 2012). Além disso, este estudo deve ser realizado por profissionais qualificados e com recurso a métodos validados, já que a fiabilidade do resultado está diretamente relacionada com a precisão dos métodos utilizados. O desenvolvimento de metodologias validadas para a determinação do prazo de validade dos produtos alimentares é atualmente exigido pelas indústrias de alimentos e Autoridades de Saúde em escala nacional e internacional (Valero *et al.*, 2012; Ceylan, 2007; Galić, 2009).

Desta forma, é imprescindível dar ênfase a determinadas considerações prévias, tais como: **(i)** garantir que os alimentos submetidos ao estudo do prazo de validade são seguros antes de serem avaliados pelo painel de análise sensorial; **(ii)** repetir o estudo aquando de possíveis mudanças na cadeia de produção ou transformação do produto; **(iii)** ao realizar o estudo tendo por base os métodos indiretos, há a necessidade de acompanhar continuamente o prazo de validade do produto; **(iv)** documentar os estudos realizados; **(v)** usufruir de um modelo definido para a realização dos estudos (Rumpf, 2008).

1.2.1.1 Métodos Diretos

São os métodos mais comumente utilizados, e têm como base de trabalho submeter os produtos a um armazenamento em condições predeterminadas por um intervalo de tempo superior ao prazo de validade expectável. As condições selecionadas

devem ter em atenção as características propostas nas etapas de processamento, embalagem, armazenamento e distribuição. Posteriormente, é feita a determinação através de análises químicas, sensoriais e microbiológicas em intervalos regulares e definidos durante um determinado período de tempo até ao limite de aceitação, no decurso do qual se verifica as alterações na qualidade do produto (mudanças na qualidade microbiana, sensorial e estabilidade físico/química) e o tempo que ele leva para se deteriorar até ao limite que o torna impróprio para o consumo (NZFSA, 2005; Rumpf, 2008; Galić, 2009; Subramaniam, 2010).

Usualmente, a determinação do prazo de validade dos alimentos é feita tendo por base diferentes etapas e o estudo pode variar de acordo com o conhecimento prévio do alimento em causa. Como não é possível delinear um protocolo específico para cada produto alimentar, os estudos gerais devem incluir os pontos descritos na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 Etapas realizadas no método direto para a determinação do Prazo de Validade de diferentes alimentos (adaptado de NZFSA, 2005; Galić, 2009)

Etapas do método direto para a determinação do prazo de validade
<i>Antes da comercialização do produto</i>
a) Identificação das causas de degradação do alimento
b) Seleção/Decisão dos testes a realizar
c) Planeamento do estudo do prazo de validade
d) Realização do estudo do prazo de validade
e) Determinação do prazo de validade
<i>Após comercialização do produto</i>
f) Monitorização do prazo de validade

1.2.1.2 Métodos Indiretos

Esta metodologia, diferente dos métodos tradicionais, emprega um armazenamento acelerado e/ou modelagem microbiológica preditiva. A aplicação deste tipo de determinação tem sido cada vez mais usual, devido à consciencialização por parte dos técnicos alimentares de que os métodos tradicionais aplicados no estudo do prazo de validade dos géneros alimentícios são limitados, no que diz respeito, por exemplo, à rapidez necessária no desenvolvimento de novos produtos que impedem a prossecução de testes do prazo de validade em tempo real. Tal como nos métodos diretos, o procedimento adotado pelos métodos indiretos é exato e único para cada produto (Mizrahi, 2000; NZFSA, 2005; Rumpf, 2008; Galić, 2009).

O estudo do prazo de validade por “testes acelerados” consiste num método capaz de avaliar a estabilidade do produto, por meio de dados que são obtidos num curto

espaço de tempo, comparativamente ao tempo real de vida do produto. Estes estudos poderão ser particularmente úteis para os produtos com prazo de validade mais longo (NZFSA, 2005; Corradini e Peleg, 2007; Galić, 2009). Nestes métodos são utilizadas condições ambientais aceleradas, a fim de aumentar a taxa de deterioração, cujo processo de degradação pode ser físico, químico e/ou microbiano. Os resultados são então utilizados para estimar o prazo de validade sob condições normais de armazenamento. Por conseguinte, a realização de testes acelerados visam fornecer medidas válidas da performance de armazenamento em condições de “abuso” a que os produtos podem estar sujeitos ao longo da cadeia de distribuição e no ambiente doméstico (Kilcast e Subramaniam, 2000; NZFSA, 2005; Rumpf, 2008; Galić, 2009). No entanto, e de acordo com Kilcast e Subramaniam (2000), apenas se justifica o recurso a este tipo de teste se existir uma relação entre as características de armazenamento à temperatura ambiente, ou à temperatura usual do produto, e as características de armazenamento sob uma condição acelerada. A “taxa inicial” e o modelo cinético são exemplos de técnicas recorrentes em estudos acelerados, sendo o modelo cinético o método mais comumente utilizado (Mizrahi, 2000; Pedro e Ferreira, 2006; García-García *et al.*, 2008).

Os métodos indiretos incluem também uma “estratégia preditiva” que utiliza modelos de dados matemáticos para calcular o crescimento microbiano sob condições definidas, apesar de ser uma abordagem que depende do conhecimento das propriedades do produto, assim como das alterações que ocorrem aquando da sua deterioração (Nakashima *et al.*, 2000; Corbo *et al.*, 2006). São modelos que estabelecem relações estatísticas e matemáticas entre fatores intrínsecos (características do produto), fatores extrínsecos (ambientais) e fatores implícitos (características do próprio microrganismo e como este se comporta na presença de combinações de fatores intrínsecos e extrínsecos). A temperatura é um dos fatores extrínsecos que influencia em grande escala o crescimento microbiano, na medida em que é um parâmetro que, comparativamente a outros fatores (a_w , pH), pode variar amplamente ao longo da cadeia de produção e distribuição (Galić, 2009). Os modelos preditivos permitem avaliar parâmetros cinéticos de crescimento dos microrganismos, nomeadamente: duração da fase lag (λ), velocidade específica de crescimento (μ) e densidade populacional máxima de crescimento (A) (Baty e Delignette-Muller, 2004). Na verdade, estes modelos consistem em estratégias microbiológicas que englobam modelos primários (descrevem a cinética do processo, isto é, a sobrevivência/inativação dos microrganismos em função do tempo) e modelos secundários (permitem prever a variação nos parâmetros cinéticos em função da variação de uma condição ambiental) (McDonald e Sun, 1999; McMeekin *et al.*, 2002; Valero *et al.*, 2012). A maioria dos modelos preditivos são específicos para

determinados tipos de microrganismos. É importante referir que são modelos úteis como um primeiro passo para a avaliação do prazo de validade de um produto alimentar. Por sua vez, não podem substituir as análises microbiológicas, sendo a microbiologia preditiva uma ferramenta complementar. Além disso, apesar da informação recolhida apresentar grande utilidade, devem ser comprovados com um estudo acelerado ou um método direto de estimativa do prazo de validade (Baranyi e Roberts, 1995; Blackburn, 2000; FSAI, 2005; Rumpf, 2008).

Capítulo 2

O Peixe: Caracterização, Deterioração e Conservação

Os padrões de consumo alimentar têm vindo a mudar ao longo dos tempos. Nas últimas décadas tem-se assistido, de forma quase global, a mudanças nos hábitos alimentares dos consumidores, que demonstram a complexidade dos modelos de consumo e dos seus fatores determinantes. As relações estabelecidas entre a produção e o consumo não são apenas determinadas por fatores económicos, mas também por fatores de ordem social, cultural e nutricional, que revelam as várias dimensões em torno das necessidades da sociedade contemporânea (Alpuche-Solís e Paredes-López, 2001; Watanabe *et al.*, 2009; Washi, 2012).

2.1 Consumo de Peixe e seus Benefícios

Tendo em vista hábitos de alimentação saudáveis, o consumo de peixe tem recebido por parte dos consumidores cada vez mais atenção. É sabido que o peixe na sua generalidade é muito nutritivo, saboroso e de fácil digestão, apresentando na sua composição como componentes principais as proteínas com 8-25% (contêm todos os aminoácidos essenciais, sendo uma excelente fonte de lisina, metionina e cisteína) e os lípidos, 0,5-30% (maioritariamente ácidos gordos ómega-3 de cadeia longa, como o ácido eicosapentaenóico – EPA; e o ácido docosahexaenóico - DHA). Adicionalmente, são fonte de vitaminas (vitaminas do complexo B e, no caso de espécies com maior teor lipídico, vitaminas A e D) e minerais essenciais (cálcio, fósforo, ferro, cobre e selénio). (Huss, 1995a; FAO/WHO, 2010; FAO, 2014). Segundo Domingo *et al.* (2007), estima-se que o consumo de uma refeição de peixe “gordo” por dia pode resultar numa ingestão de ácidos gordos ómega-3 de aproximadamente 900mg/dia, o ideal numa alimentação saudável e, conseqüentemente, para a prevenção de certos tipos de doenças, nomeadamente doenças cardiovasculares. Apesar da composição química do peixe variar de espécie para espécie, e depender da idade, sexo e época do ano, é uma mais valia para a saúde do consumidor dar preferência a este tipo de produto na sua alimentação (Huss, 1995a; Domingo, 2007; Verbeke *et al.*, 2007; Jabeen e Chaudhry, 2011; FAO, 2014). Contudo, para que ofereça ao consumidor todos os potenciais benefícios, é imprescindível que o peixe não contenha contaminantes e que se mantenha seguro e com qualidade até ao seu consumo (Poli, 2005; Domingo, 2007).

2.2 Principais Reações de Deterioração

Após captura, o peixe é considerado um alimento muito perecível (elevada a_w , pH próximo da neutralidade e rico em enzimas autolíticas), pelo que, se o seu armazenamento não for adequado, podem ocorrer várias alterações de natureza química, microbiológica e sensorial, responsáveis pela sua degradação e, consequentemente, pela sua rejeição por parte do público consumidor (Sivertsvilk *et al.*, 2002; Ghaly *et al.*, 2010). A deterioração deve-se, essencialmente, à ocorrência de reações de oxidação ou hidrólise enzimática da fração lipídica e ao desenvolvimento microbiano (Huss, 1995b; Rodríguez *et al.*, 2009; Ghaly *et al.*, 2010), fatores que variam, por exemplo, consoante a espécie e características do próprio peixe (tipo de peixe, tamanho, teor de gordura e grau de maturação), as condições de captura, o tipo e quantidade inicial de flora microbiana presente no animal, e condições de processamento e conservação (Sivertsvilk *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2009; FAO, 2014).

2.2.1 Alterações Autolíticas e Oxidação Lipídica

As alterações autolíticas são as principais responsáveis pela perda inicial da qualidade do peixe. As reações autolíticas provocam a perda de firmeza do músculo do animal, além de disponibilizarem o substrato necessário para o metabolismo das bactérias no processo deteriorativo (Huss, 1995b; Aubourg, 2001; Ghaly *et al.*, 2010; FAO, 2014). Estas abrangem diversas reações de degradação, como:

(i) Decomposição aeróbia e anaeróbia de glicogénio no músculo do peixe (por exemplo, na maioria dos peixes ósseos a glicólise anaeróbia é a única forma de produção de energia após a sua morte, em que a concentração de glicogénio e adenosina trifosfato (ATP) vai diminuir, e, por outro lado, um aumento de compostos resultantes da desfosforilação e desaminação do ATP, tais como inosina monofosfato, hipoxantina, entre outros);

(ii) Proteólise (deterioração menos perceptível comparativamente às alterações verificadas ao nível da degradação do ATP, mas que, quando ocorre, provoca um aumento do teor de aminoácidos livres e péptidos de baixa massa molecular, nomeadamente as catepsinas).

A oxidação lipídica é um processo de deterioração química que ocorre ao nível da fração lipídica do peixe. A autooxidação é uma reação que envolve o oxigénio e os ácidos gordos polinsaturados, sendo por isso mais recorrente em peixes gordos. O primeiro passo leva à formação de hidroperóxidos (não conferem nenhum sabor ou odor, mas que podem levar ao aparecimento de colorações castanhas ou amarelas), cuja degradação dá origem à formação de aldeídos e cetonas (compostos com elevado sabor e odor a

ranço). Os compostos de oxidação lipídica podem interagir com os derivados de proteínas, conduzindo a perdas nutricionais do produto. Para além das alterações ao nível do sabor e odor, as substâncias resultantes desta reação também são responsáveis por alterações ao nível da textura (Huss, 1995b; Aubourg, 2001; Ghaly *et al.*, 2010; FAO, 2014).

2.2.2 Alterações Microbiológicas

Relativamente às alterações de natureza microbiológica é de realçar o facto da microflora inicial do peixe ser muito diversa, apesar das bactérias psicrótróficas Gram negativas serem, frequentemente, dominantes. Na verdade, a sua flora microbiana está intimamente relacionada com a contaminação envolvente ao seu ambiente de origem (por exemplo, espécies capturadas em águas tropicais e zonas poluídas apresentam, normalmente, maior carga microbiana) e a fatores intrínsecos e extrínsecos (por exemplo, condições de processamento e armazenamento, pH, fração de azoto não proteico, entre outros). Os microrganismos dominantes em peixes de águas temperadas são os psicrótróficos, aeróbios ou anaeróbios facultativos Gram negativos, bactérias em forma de bastonetes, e, em particular, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella putrefaciens*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Vibrio*, *Photobacterium* e *Aeromonas*. Em peixes de águas salgadas e de águas doces podem ser encontrados *Vibrio*, *Photobacterium* e *Shewanella putrefaciens*, e *Aeromonas* spp., respetivamente. Durante o armazenamento a temperaturas de refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), a deterioração microbiana pode resultar fundamentalmente da ação de bactérias psicrótróficas e psicrófilas. A temperaturas mais elevadas (25°C), a microflora no ponto de deterioração é dominada pela presença de *Vibrionaceae* e, se o peixe é capturado em águas poluídas, a mais característica é *Enterobacteriaceae*. Um dos fatores intrínsecos que favorece o crescimento microbiano é a fração de azoto não proteico (aminoácidos livres, nucleótidos), utilizada como substrato por alguns microrganismos, sendo o óxido de trimetilamina (OTMA) um constituinte desta fração. O OTMA pode ser reduzido a trimetilamina (TMA) por enzimas endógenas, mas na maior parte das vezes esta redução pode derivar, em condições de refrigeração e ausência de oxigénio, da ação de determinadas bactérias, nomeadamente *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, entre outras. Pela observação da Tabela 2.1 é possível verificar as principais bactérias responsáveis pela degradação de peixe fresco e respetivos compostos de deterioração (Sivertsvilk *et al.*, 2002; Ghaly *et al.*, 2010).

Tabela 2.1 Compostos resultantes da deterioração microbiana em peixe fresco (adaptado de Sivertsvilk *et al.*, 2002; Ghaly *et al.*, 2010)

Bactérias específicas de deterioração	Compostos de deterioração
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Trimetilamina (TMA), Sulfureto de hidrogénio (H ₂ S), Metilmercaptano (CH ₃ SH), Dimetilsulfito ((CH ₃) ₂ S), Hipoxantina (Hx)
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Trimetilamina (TMA), Hipoxantina (Hx)
<i>Pseudomonas</i> spp.	Cetonas, Aldeídos, Ésteres, Metilmercaptano (CH ₃ SH), Dimetilsulfito ((CH ₃) ₂ S)
<i>Vibrionaceae</i>	Trimetilamina (TMA), Sulfureto de hidrogénio (H ₂ S), Sulfuretos não produtores de H ₂ S

2.2.3 Alterações Sensoriais

As primeiras alterações sensoriais durante o armazenamento de peixe fresco ocorrem ao nível da textura e aparência. De facto, imediatamente após a morte do peixe o músculo está totalmente relaxado (textura elástica e flexível), mas passado algumas horas instala-se um processo designado por *Rigor mortis*, associado a uma perda da flexibilidade do músculo. A resolução deste estado é acompanhada por um novo relaxamento do músculo e recuperação da sua flexibilidade inicial, apesar de não se verificar o mesmo com a sua elasticidade. O momento de aparecimento e posterior resolução do *Rigor mortis* varia com a espécie, temperatura, manuseamento, tamanho e condição fisiológica do peixe.

A aparência é uma característica sensorial que permite também confirmar a perda de qualidade deste tipo de produto, em que é comum o desenvolvimento de coloração anormal (castanha ou amarela) como resultado da formação de hidroperóxidos, bem como o aparecimento de manchas devido à ação das enzimas digestivas. A par destas alterações, também são detetáveis mudanças ao nível do sabor e odor, na medida em que alguns compostos resultantes da deterioração microbiana e oxidação lipídica conferem ao produto odores e sabores desagradáveis (por exemplo, a produção de sulfureto de hidrogénio associado a um odor pútrido, formação de aldeídos e cetonas responsáveis pelo sabor e odor a ranço, formação de metilmercaptano associado a um cheiro enjoativo, entre outros) (Huss, 1995b).

2.3 Principais Métodos de Conservação

Tendo em vista os principais mecanismos de deterioração do peixe, é comum a aplicação de diferentes técnicas de conservação, com a finalidade de preservar as suas qualidades e, desta forma, aumentar o seu prazo de validade. Nas últimas décadas, a globalização do comércio mundial tem vindo a aumentar e tem um impacto sobre os

consumidores. É notável a progressiva mudança das necessidades e hábitos alimentares das populações, nomeadamente um crescente interesse por produtos primários e transformados, e produtos alimentares que englobam os pré-preparados, pré-cozinhados ou prontos a consumir (Creed, 2001). Aliando a preocupação em procurar alcançar as exigências e expectativas dos consumidores com a garantia de que o produto mantém a sua qualidade por um maior período de tempo, são diversas as opções de processamento debruçadas na conservação do peixe, por exemplo, congelamento, conserva, cura, atmosfera modificada, entre outros. Todavia, a comercialização do peixe como produto fresco tende a ser a mais aceite no mercado, como pode ser constatado pela observação da Figura 2.1. Adicionalmente, é de salientar que a utilização do peixe processado para consumo humano tem-se mantido estável mundialmente, com aproximadamente 39 milhões de toneladas, sendo o congelamento o principal método de processamento, com cerca de 53% do total de peixe processado em 2002, seguido das conservas (27%) e da cura (20%) (Opara *et al.*, 2007).

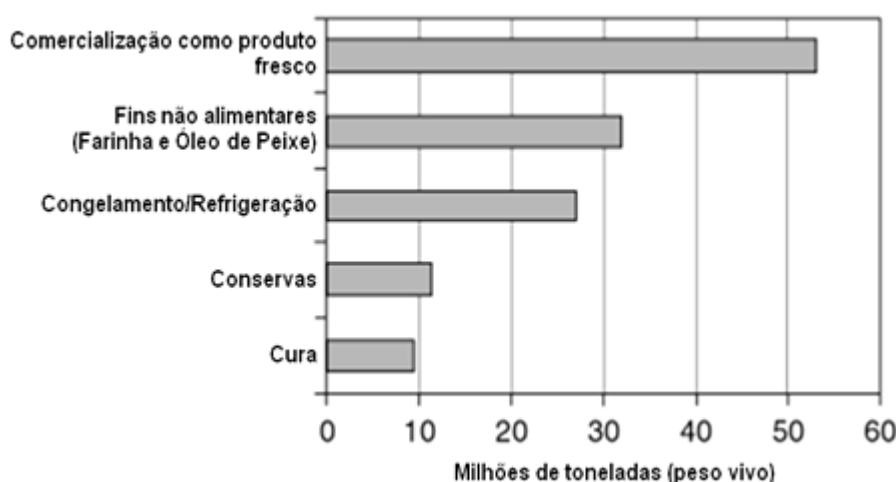


Figura 2.1 Formas mais comuns de comercialização do pescado a nível mundial (adaptado de Opara *et al.*, 2007)

Existe uma ampla gama de tecnologias concebidas para inibir ou reduzir as alterações metabólicas responsáveis pela deterioração do peixe. Têm como base o controlo dos parâmetros específicos do peixe e/ou do seu ambiente, sendo elas baseadas no (Ghaly *et al.*, 2010; FAO, 2014):

- ♦ **Redução da temperatura** – as temperaturas utilizadas neste tipo de processamento podem ser reduzidas a cerca de -18°C (congelamento) e 0°C (refrigeração), de forma a reduzir ou inibir as atividades metabólicas, catalisadas por enzimas autolíticas, bem como a atividade microbiana. É sabido que o peixe

congelado apresenta maior prazo de validade comparativamente ao peixe refrigerado;

- ♦ **Processamento térmico** – o cozimento, branqueamento, pasteurização, esterilização, irradiação ou aquecimento por microondas são exemplos de métodos de conservação que garantem este tipo de controlo físico. No caso do processo de cozimento e pasteurização, a carga microbiana do produto não é completamente inativada, pelo que é importante a sua combinação com outra técnica de preservação, como a refrigeração. O mesmo não é necessário para produtos esterilizados, como é o caso das conservas, que são estáveis à temperatura ambiente. Mais adiante será descrito com mais detalhe as características do processamento de conservas de peixe;
- ♦ **Controlo da atividade da água (a_w)** – a água disponível no peixe potencia o metabolismo microbiano e as reações enzimáticas, daí a secagem, salga, liofilização e a utilização de humectantes, serem métodos de preservação que podem, também, aumentar o prazo de validade destes produtos;
- ♦ **Controlo químico da atividade microbiana** – este controlo químico visa a inibição do desenvolvimento microbiano através da diminuição do valor de pH do peixe (<4,5), recorrendo à fermentação ou à adição de ácidos (acético, cítrico, láctico, entre outros). Como resultado da fermentação das bactérias lácticas é possível obter compostos anti-microbianos (por exemplo, a nisina), capazes de contribuir para a preservação deste produto alimentar. Além disso, os nitritos, sulfitos, sorbatos e benzoatos são conservantes químicos utilizados para o mesmo fim;
- ♦ **Controlo do potencial oxidação-redução** – a redução dos níveis de oxigénio da atmosfera envolvente ao peixe incrementa um aumento do seu prazo de validade, na medida em que a oxidação lipídica, assim como algumas das bactérias responsáveis pela sua deterioração, necessitam da presença de oxigénio para o seu desenvolvimento. Por conseguinte, o recurso a embalagens a vácuo ou com atmosfera modificada, em combinação com temperaturas de refrigeração, é também uma boa opção para a conservação de peixe.

2.4 Conservas de Peixe

Como já foi descrito, após captura do peixe, e devido à sua componente físico-química e microbiológica, este torna-se naturalmente suscetível a uma rápida degradação, pelo que há a necessidade de garantir que se mantém com qualidade,

fresco ou processado, até posterior consumo. O enlatamento é um método de conservação de peixe com elevado reconhecimento e valorização tanto por parte da indústria alimentar como do público consumidor. No caso de conservas de peixe o consumidor pode aliar o benefício do consumo de peixe com a conveniência do produto (pronto a comer e economicamente acessível).

Segundo o *Codex Alimentarius* (1979) um alimento enlatado é definido como um *“alimento comercialmente estéril em recipientes hermeticamente fechados”*, que vai ao encontro da definição de conserva dada pelo Decreto de Lei nº375/98, de 24 de Novembro de 1998, em que é descrita como um *“processo que consiste em acondicionar produtos em recipientes hermeticamente fechados e submetê-los a um tratamento térmico suficiente para destruir ou tornar inativos todos os microrganismos suscetíveis de proliferação, qualquer que seja a temperatura a que o produto se destine a ser armazenado”*. Ainda neste contexto, é importante ter ciente qual a definição de esterilidade comercial ou estabilidade de prateleira que, de acordo com a *Food and Drug Administration (FDA)*, consiste *“nas condições alcançadas por um produto através da aplicação de calor, para o tornar livre de microrganismos capazes de se reproduzirem sob condições normais não-refrigeradas de armazenamento e distribuição”* (FDA, 2014).

2.4.1 Processo de Transformação em Conserva

A indústria conserveira deve garantir um controlo contínuo da qualidade ao longo das etapas do processo através da aplicação das boas práticas de fabrico, de forma a obter produtos seguros e com qualidade (Codex Alimentarius, 1969). O processo de transformação em conserva tem como base um procedimento de fabrico composto por diferentes etapas que variam consoante o produto final.

2.4.1.1 Receção da Matéria-Prima e Armazenamento

Após compra, e durante o transporte até à fábrica, é fundamental assegurar a integridade da matéria-prima (peixe), na medida em que esta influenciará a qualidade do produto final. No transporte deve ser mantida a temperatura de refrigeração ou de congelação, garantindo que o material em contacto com o produto não incrementa a deterioração do mesmo (por exemplo, seja isolante, impermeável, resistente à corrosão, e fácil de limpar e desinfetar, além de não alterar as características do peixe, nem transmitir substâncias nocivas). No caso de sardinha fresca, a qualidade à entrada da fábrica é avaliada pelo seu grau de frescura, sendo a avaliação sensorial a principal técnica utilizada. Por sua vez, pode haver a necessidade, no caso de dúvidas, de

proceder à aplicação de métodos químicos e microbiológicos (Codex alimentarius, 2003; Monraia *et al.*, 2006).

Posteriormente à sua chegada à fábrica e avaliação da qualidade, a matéria-prima deve ser processada o mais rapidamente possível. Quando tal não for possível, o peixe fresco ou refrigerado deve ser armazenado sob gelo em câmaras a temperaturas de refrigeração, entre 0 e 2°C. No caso de submeter a matéria-prima a temperaturas de congelação, também devem ser garantidas as condições ideais para a sua conservação. Por conseguinte, aquando da utilização de matéria-prima congelada é necessário garantir uma descongelação controlada (tempo e temperatura) (Tato e Martins, 2000; Monraia *et al.*, 2006).

2.4.1.2 Pré-Tratamento da Matéria-Prima

Dependendo do fim a que se destina, o peixe pode ou não ser imerso numa solução de água e cloreto de sódio, designada por “salmoura”. Esta solução proporciona a remoção de mucosidades, escamas soltas, sangue e impurezas aderentes ao peixe. Adicionalmente, permite melhorar a textura do músculo (por exemplo, soluções com um nível de sal elevado conferem uma textura mais dura ao peixe) e a aderência da pele, bem como o seu sabor (concentração de sal no peixe) (Monraia *et al.*, 2006). A utilização de uma solução salina, pelo seu efeito osmótico, gera alterações no metabolismo celular do peixe, originando uma diminuição da a_w na sua superfície que funcionará como barreira contra a atividade microbiana. Após cada utilização, deve ser verificado o grau de saturação das salmouras, para serem renovadas no caso de não estarem de acordo com o estipulado. Este controlo permite evitar a acumulação de impurezas e o desenvolvimento de microrganismos tolerantes a elevadas concentrações salinas (halófitos), assim como a alteração sensorial do produto final, principalmente a nível gustativo (Tato e Martins, 2000; Monraia *et al.*, 2006; Albarracín *et al.*, 2011).

A etapa posterior à salmoura consiste no descabeçamento, evisceração e remoção da cauda, ajustadas ao tipo de peixe em causa. Estas operações podem ser realizadas manualmente ou mecanicamente, não esquecendo que devem ser adotadas boas práticas de higiene tanto pelo pessoal envolvente a esta etapa, como das máquinas destinadas para o mesmo fim. Além disso, em ambos os casos não deve ocorrer a rotura das vísceras, para que não haja a contaminação do músculo do peixe com microrganismos oriundos destas. Por último, para que sejam removidas impurezas, escamas soltas, sangue e vísceras na cavidade abdominal, os lombos ou filetes, obtidos após corte da matéria-prima, são sujeitos a uma lavagem com água potável (Warne, 1988; Monraia *et al.*, 2006).

2.4.1.3 Enlatamento

No caso de conservas de peixe as embalagens mais comumente utilizadas são as metálicas, nomeadamente as de folha-de-Flandres ou alumínio. As embalagens devem ser estanques, inertes interna e externamente em condições normais de armazenamento, e apresentar resistência mecânica suficiente para suportarem as temperaturas e pressões aplicadas na esterilização. Tal como com a matéria-prima, deve ser garantida a conformidade das características e integridade dos materiais de embalagem aquando da sua receção e acondicionamento na fábrica (Warne, 1988; Monraia *et al.*, 2006).

A etapa de enlatamento ou enchimento pode ser feita manual ou mecanicamente (a Figura 2.2 retrata o enlatamento manual). Os lombos de peixe podem ser colocados na lata já cozidos (em grelhas) ou em cru, consoante o tipo de produto final que se pretende obter (Monraia *et al.*, 2006). Em ambas as formas de enchimento, é importante garantir que fica algum espaço livre na lata, para que a expansão resultante do processamento térmico não origine uma acumulação excessiva de pressão no seu interior (Warne, 1988).



Figura 2.2 Enlatamento Manual de Sardinha

2.4.1.4 Cozedura

Esta fase tem como finalidade retirar parte da água presente no músculo do peixe (caso não acontecesse nesta operação, a água iria aparecer no molho após a esterilização) e reduzir a atividade bacteriana e enzimática. Na verdade, o cozimento faz coagular as proteínas, libertando a água. Para que no produto final não apareça um excesso de resíduo aquoso no molho, o tempo e temperatura de cozedura devem ser estabelecidos tendo por base o fim a que se destina a matéria-prima, o tamanho (é importante que o “centro” do peixe atinja a temperatura que se pretende), tipo e teor de gordura do peixe, sendo usualmente seguidos de um período de escorrimento. É imprescindível manter as condições de higiene e conservação recomendadas do cozedor, com particular atenção à adequada exaustão de vapor no momento da sua utilização. O cozimento pode ser efetuado com água quente ou salmoura, com vapor ou óleo quente, de acordo com o produto e fim ao qual se destina (Warne, 1988; Tato e Martins, 2000; Monraia *et al.*, 2006).

Posteriormente à etapa de cozimento, é recomendado o arrefecimento das latas, de maneira a minimizar a quantidade de água que permanece nas mesmas. A área onde se processa esta operação deve estar em boas condições de higiene. Esta fase do processo tem de ser realizada num curto período de tempo, uma vez que se podem criar condições ótimas para a deterioração do produto, como o crescimento de microrganismos (Tato e Martins, 2000; Monraia *et al.*, 2006).

2.4.1.5 Cravação

Segundo Monraia *et al.* (2006), cravação é denominada como “a operação pela qual se faz mecanicamente a união do tampo e do corpo da lata, de modo a obter uma embalagem hermeticamente fechada”. A eficácia da cravação é uma das garantias da conservação deste produto. Previamente à cravação é feita a adição do molho, que pode ser adicionado quente ou frio, mas que deve ser sempre em excesso, para que todos os espaços vazios da lata sejam preenchidos.

A etapa de cravação é realizada por três fases, nomeadamente: **(i)** fase de assentamento e compressão (transformação do rebordo do corpo em gancho do corpo); **(ii)** fase de enrolamento (o bordo do corpo é enrolado com o bordo do tampo); **(iii)** fase de aperto (compressão do enrolamento) (Figura 2.3) (Warne, 1988; Larousse e Brown, 1997; Monraia *et al.*, 2006). Deve haver uma inspeção em intervalos regulares das latas cravadas, para que, caso se verifiquem valores próximos dos mínimos (compactação - 75%; sobreposição - 45%; e engachamento do gancho do corpo - 70%), se proceda ao ajuste imediato das cravadeiras (Monraia *et al.*, 2006).

Numa fase posterior, procede-se à lavagem das latas com água (40°C) e, havendo necessidade, podem utilizar-se detergentes (eliminar restos de gordura e outros resíduos), adequados à indústria alimentar (Monraia *et al.*, 2006).

2.4.1.6 Esterilização

Na confeção deste tipo de produtos, é fundamental a aplicação de tratamentos térmicos eficazes, capazes de controlar e/ou inativar microrganismos responsáveis pela degradação dos parâmetros de qualidade e com implicações a nível da saúde pública. Este tratamento é projetado com o objetivo de garantir a esterilidade comercial do produto, para que possa ser conservado à temperatura ambiente por um longo período de tempo, como é característico dos produtos enlatados (Warne, 1988). Deve-se dar início à esterilização logo após a etapa de cravação, para evitar o desencadeamento de reações de deterioração à temperatura ambiente (Monraia *et al.*, 2006). Enquanto a pasteurização consiste num processo térmico em que é utilizada uma temperatura

relativamente leve (por exemplo, 70-100°C), suficiente para a destruição das células vegetativas, mas não dos esporos, a esterilização engloba um tratamento térmico a altas temperaturas (superior a 100°C) capaz de destruir todas as formas de microrganismos, incluindo os esporos (Berk, 2009).

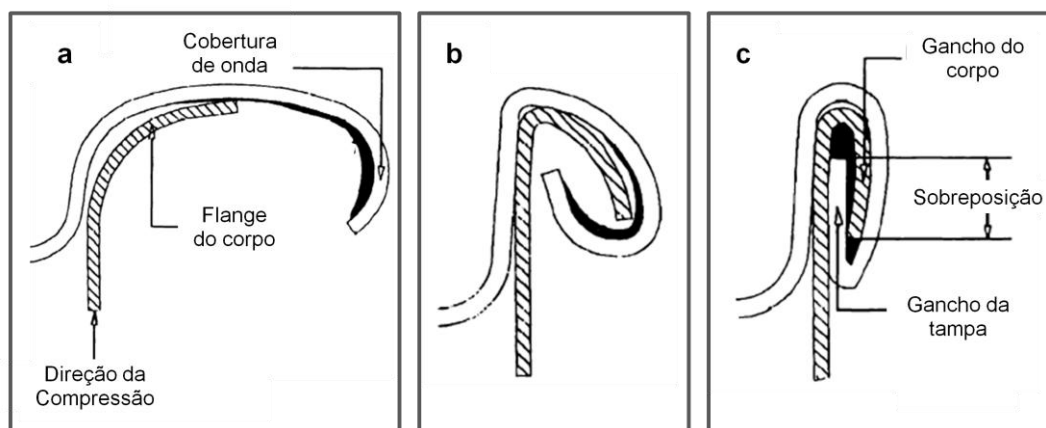


Figura 2.3 Etapas da cravação na formação de uma costura dupla: **(a)** fase de assentamento e compressão, **(b)** fase de enrolamento e **(c)** fase de aperto (adaptado de Larousse e Brown, 1997)

Na verdade, de entre as várias etapas a que são submetidos os produtos de conserva, a esterilização é a operação que requer mais atenção por parte da indústria. A temperatura não é o único fator que contribui para a eficácia da esterilização, mas também o tempo é tido em consideração, sendo a combinação destes dois fatores a principal base para a eficiência do processo. O binómio tempo-temperatura é influenciado pelas características do produto alimentar (pH, a_w e teor de sal), incluindo as propriedades térmicas, forma e tamanho do recipiente que o contém, e pelo tipo e resistência térmica dos microrganismos alvo que possam estar presentes no alimento, bem como a forma em que se encontram (vegetativa ou esporulada) (Awuah *et al.*, 2007).

Pela análise da Figura 2.4 (a), em que é ilustrada a curva de sobrevivência microbiana, é possível verificar que o intervalo de tempo necessário para uma redução decimal no número de microrganismos é constante. Este intervalo de tempo, conhecido como o “tempo decimal de redução” ou o “valor D”, é imprescindível para a destruição dos esporos bacterianos e, apesar de ser afetado pela temperatura (quanto maior for a temperatura aplicada, mais rápida é a velocidade de destruição térmica e, consequentemente, menor o valor D), como observado na Figura 2.4 (b), é independente do número inicial de esporos presente no produto (Warne, 1988; Awuah *et al.*, 2007).

De todos os fatores atrás enumerados, o pH tem uma forte influência na resistência térmica das bactérias. De acordo com a sua acidez, os produtos alimentares podem ser classificados em alimentos de baixa acidez (pH > 4,6), ácidos (pH 3,7 - 4,6), ou

de elevada acidez ($\text{pH} < 3,7$). As conservas de peixe enquadram-se nos alimentos de baixa acidez. É notável que à medida que o valor de pH diminui, a sensibilidade do microrganismo à temperatura aumenta. Em enlatados cujo valor é igual ou inferior a 4,6 a temperatura de referência é de $93,3^{\circ}\text{C}$, inativando totalmente todas as bactérias vegetativas e parcial ou totalmente os esporos. Em alimentos com menor acidez a temperatura ideal é de 121°C , de forma a garantir a inativação/destruição total das bactérias vegetativas e esporos. Assim, consoante o pH do alimento, a intensidade do tratamento térmico deve ser ajustada para garantir a estabilidade microbiológica (Awuah *et al.*, 2007; Evancho *et al.*, 2009; André *et al.*, 2013).

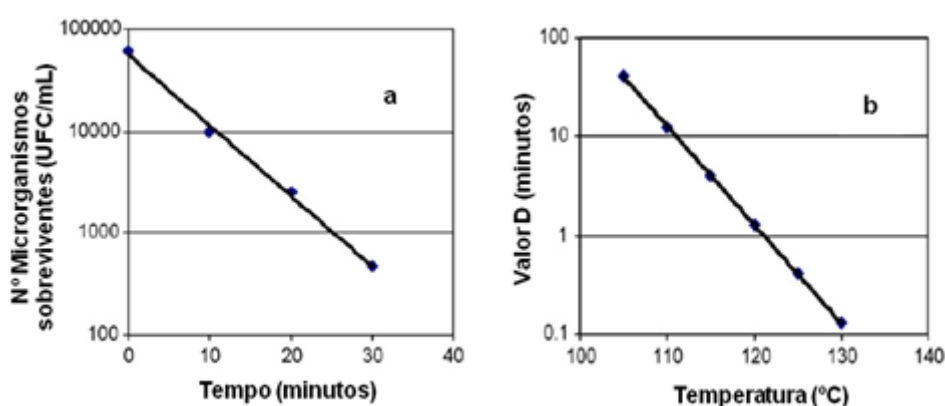


Figura 2.4 Curvas típicas de sobrevivência de esporos bacterianos, em que **(a)** Curva de Sobrevivência e **(b)** Curva Valor D (adaptado de Awuah *et al.*, 2007)

A esterilização, realizada tanto em autoclaves verticais como horizontais, engloba três fases, sendo elas: **(i)** fase de aquecimento até atingir a temperatura de esterilização; **(ii)** fase constante à temperatura de esterilização; **(iii)** fase de arrefecimento. O tempo correspondente à fase de aquecimento varia com o tipo de autoclave (vertical ou horizontal) e com o tipo de fluído de aquecimento utilizado. No final devem ser feitos controlos por amostragem, com a finalidade de avaliar a eficácia do tratamento térmico. São exemplos de provas aplicadas para esta avaliação os testes de incubação, como a prova de estabilidade e esterilidade de acordo com os métodos descritos nas normas NP 2309-1:1988 e NP 2309-2:1988, respetivamente, e testes microbiológicos do conteúdo (Monraia *et al.*, 2006).

No final desta etapa, é imprescindível assegurar que as latas estejam totalmente frias e secas para que seja possível o manuseamento das mesmas na fase seguinte. Este arrefecimento deve ser realizado de forma correta, para que não sejam incrementadas alterações nas características sensoriais do produto final como resultado

de um sobrecozimento, bem como a nível microbiológico, que pode levar à germinação e crescimento de microrganismos termófilos esporulados (Ray, 2004; Monraia *et al.*, 2006).

2.4.1.7 Embalagem e Expedição

Depois de estarem totalmente secas e arrefecidas, prossegue-se para a rotulagem, através da impressão do respetivo lote e prazo de validade. Ainda nesta fase devem ser realizados testes, logo após a produção (para que sejam feitas correções a possíveis falhas detetadas), numa amostragem representativa de cada lote codificado para verificar se estão presentes defeitos ou se o produto está em conformidade, por exemplo, com os padrões de peso pré-estabelecidos. Durante o encaixotamento as latas devem ser novamente inspecionadas para que sejam retiradas as defeituosas. As caixas, devidamente etiquetadas, são armazenadas em armazém até posterior expedição para os mercados em contentores e camiões próprios para este fim (Warne, 1988).

Previamente à sua expedição, as latas devem ter um tempo de quarentena. Este período é fundamental, na medida em que é nesta fase que o sal, o molho e outras especiarias se combinam homogeneamente com o produto. É ainda importante salientar que apenas quando este equilíbrio é alcançado é que o produto atinge o seu pleno sabor e em alguns casos a textura desejada. A qualidade do produto final é influenciada pelas condições externas de armazenamento. A seleção da temperatura pode ser crítica para produtos enlatados que contêm microrganismos termófilos formadores de esporos sobreviventes. Quando estas são desfavoráveis, como flutuações extremas de temperatura, nomeadamente armazenamento a temperaturas muito altas ou muito baixas, as reações que podem ocorrer entre o conteúdo e a própria embalagem são aceleradas, e pode inclusive haver a formação de água de condensação responsável pela corrosão das latas. Por exemplo, a temperatura ambiente em regiões de clima quente pode incrementar o crescimento e multiplicação de termófilos, pelo que o processo térmico aplicado deve ser eficiente de forma a destruir ou reduzir as bactérias extremamente resistentes ao calor para um nível suficientemente baixo. Posto isto, as condições de armazenagem devem ser respeitadas para que não seja comprometida a segurança do produto (Warne, 1988; Tato e Martins, 2000). Mais adiante serão abordados com mais pormenor os aspetos microbiológicos envolventes ao processamento térmico.

2.5 Principais Fatores Associados à Deterioração de Conservas de Peixe

A deterioração de produtos enlatados deve-se, essencialmente, a reações químicas, enzimáticas e de natureza microbiana (Ray, 2004). É crucial conhecer quais os fatores que colocam em causa a qualidade e segurança deste tipo de produto e, como tal, será feita uma abordagem às principais causas de deterioração.

2.5.1 Deterioração Físico-Química

O desenrolar de reações hidrolíticas e oxidativas nas componentes proteica e lipídica do produto, e a migração de iões metálicos a partir da superfície interior da lata para o produto, são exemplos de processos químicos e físicos que irão influenciar a qualidade das conservas no decorrer do seu armazenamento. Por exemplo, as reações químicas podem levar à produção de H_2 e CO_2 , a um escurecimento e corrosão da lata. Além disso, as reações enzimáticas também podem incrementar alterações no produto, nomeadamente liquefação, gelificação e descoloração (Lukoshkina e Odoeva, 2003; Ray, 2004).

Nas conservas, o produto é submetido a dois tipos de processamento térmico, a cozedura e esterilização, onde as enzimas e as bactérias são inativadas pelo calor. Contudo, a perda de qualidade nas conservas, nomeadamente de peixe, está também relacionada com a qualidade da matéria-prima. É sabido, e tal como já foi descrito anteriormente, que a composição lipídica deste tipo de matriz alimentar é altamente insaturada, pelo que pode ocorrer oxidação durante o armazenamento e processamento, incrementando um decréscimo na qualidade do produto. As características lipídicas do produto também são influenciadas pelas características da própria embalagem. Se o enchimento da lata com o respetivo meio líquido não for adequado, a transferência de calor para o músculo do peixe será alterada (Medina *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2009). De acordo com Naseri *et al.* (2011) alguns trabalhos anteriores demonstraram que certos componentes como aminoácidos, minerais e vitaminas hidrofílicas de conservas de peixe podem “perder-se” para o molho (em que os autores designaram por “lixiviação”). Este é um tema interessante nos dias atuais, onde a procura por produtos mais saudáveis, como os enlatados em água, podem levar à perda de alguns constituintes importantes por solubilização no molho e posterior refeição.

Simultaneamente, ao longo do armazenamento de produtos enlatados pode ocorrer a interação entre o material da embalagem e o próprio alimento, podendo haver a transferência de compostos da lata para o produto nela contido. É notório que as embalagens metálicas são suscetíveis à corrosão, o que leva ao aparecimento de alguns defeitos, nomeadamente a uma oxidação interna da lata, descoloração do conteúdo, bem

como produção de hidrogénio. A corrosão é bastante influenciada pela composição química do produto alimentar, características da placa de metal e pela presença de aceleradores de corrosão (por exemplo, dióxido de enxofre, sulfitos, nitratos ou oxigénio). O oxigénio é o principal gás que, quando presente no interior da lata, é responsável pela sua corrosão, pelo que latas que apresentem um nível baixo de vácuo têm maior suscetibilidade à corrosão. Adicionalmente, a taxa de corrosão aumenta com o aumento da temperatura de armazenamento, daí que seja necessário a conservação deste tipo de produtos num local fresco de forma a minimizar a corrosão no interior da lata. É importante também garantir que as latas estão completamente arrefecidas antes do seu empilhamento para que não ocorra dano mecânico das mesmas e eventual rutura (Parkar e Rakesh, 2014).

2.5.2 Deterioração Microbiológica

É fundamental a aplicação de um processo térmico capaz de inativar ou destruir microrganismos deterioradores e patogénicos. No tópico relativo à “Esterilização” já foram abordadas as principais características físico-químicas que influenciam o crescimento dos microrganismos neste tipo de produtos. O binómio tempo-temperatura do processo térmico aplicado irá variar consoante o pH do produto, pelo que em conservas de peixe, consideradas produtos de baixa acidez ($\text{pH} > 4,6$), a temperatura aconselhada é de 121°C , de forma a inativar/destruir totalmente as bactérias vegetativas e esporos (Evancho *et al.*, 2009; André *et al.*, 2013).

Ao nível dos perigos biológicos, e contrariamente aos alimentos enlatados com níveis de acidez mais elevados, os que apresentam baixa acidez têm grande susceptibilidade ao crescimento de, por exemplo, *Clostridium botulinum* e produção de toxinas, requerendo um tratamento térmico que destrua e inative os esporos deste microrganismo. *Clostridium botulinum* (anaeróbio estrito, Gram positivo e formador de esporos) é historicamente o organismo patogénico de referência para alimentos enlatados de baixa acidez, uma vez que neste tipo de produto alimentar são criadas condições de anaerobiose no interior da embalagem (Jay *et al.*, 2005; Evancho *et al.*, 2009; Aberoumand, 2010). O *Clostridium botulinum* com produção de toxina do tipo E é o mais comum em conservas de peixe e, como se trata de um produto pronto a comer em que não é habitual o aquecimento previamente à sua ingestão, poderá causar botulismo no consumidor uma intoxicação potencialmente fatal (Aberoumand, 2010).

A deterioração de natureza microbiológica é acompanhada por alterações que podem ser detetadas a nível sensorial (aspeto, odor, ou até mudança no pH). A maioria dos microrganismos produzem gases aquando do seu crescimento. Assim, no caso dos alimentos enlatados, o dilatar da lata é uma evidência visível de que o produto pode estar

deteriorado e, desta forma, que microrganismos responsáveis pela sua deterioração estão presentes no alimento. Contudo, o único meio para identificação de possíveis alterações por ação de microrganismos em embalagens aparentemente normais, consiste numa análise destrutiva, em que o recipiente é aberto e o produto é analisado por diferentes metodologias de natureza microbiológica. É importante reforçar que podem estar presentes na conserva organismos patogénicos sem causar o seu abaulamento, daí a importância das análises destrutivas atrás referidas (Ray, 2004; Evancho *et al.*, 2009).

Visto que a deterioração provocada por microrganismos apresenta um impacto económico na comercialização deste tipo de produtos, e potencialmente ao nível da saúde pública, é de grande importância o conhecimento de quais os principais fatores por ela responsáveis, resumidos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 Fatores responsáveis pela deterioração microbiológica de alimentos enlatados (adaptado de Evancho *et al.*, 2009)

Principais fatores responsáveis pela deterioração microbiológica
Antes do processamento térmico
<ul style="list-style-type: none"> - Características intrínsecas do produto (por exemplo, pH, a_w, etc) - Tipo e número de microrganismos presentes inicialmente no produto - Características extrínsecas ao produto (condições de armazenamento, como por exemplo, o tempo, a temperatura, etc) - Condições de armazenamento ineficientes dos produtos previamente cozinhados - Período de tempo excessivo decorrido entre a preparação do produto e o enchimento e fecho da embalagem - Práticas de higiene inadequadas aquando da manipulação do produto pelos operários - “Falhas” ao longo da linha de produção (por exemplo, linhas de latas sujas, defeituosas ou com algum nível de corrosão; manuseio e higienização inadequadas dos equipamentos; presença de microrganismos na salmoura; defeitos na cravação; etc)
Durante o processamento térmico
<ul style="list-style-type: none"> - Processamento térmico inadequado (por exemplo, a combinação tempo e temperatura)
Após processamento térmico
<ul style="list-style-type: none"> - Arrefecimento inadequado após a etapa de esterilização ou armazenamento a altas temperaturas - Defeitos na lata resultantes da ineficiente cravação, permitindo a entrada de microrganismos para o seu interior (“vazamento”)

De facto, ao longo das diferentes etapas da linha de produção, os principais fatores responsáveis pela deterioração microbiológica estão relacionados com as práticas de fabrico adotadas. A título de exemplo, a contaminação pós-processamento mais comum consiste em defeitos presentes na lata, conhecidos por “vazamentos”, resultantes de falhas ocorridas na fase de cravação (antes do processamento térmico), tidos como

veículos à entrada de organismos do meio exterior para o interior da lata, como pode ser observado na Figura 2.5 (Ray, 2004; Evancho *et al.*, 2009).

Se ocorre uma recontaminação por microrganismos, esta dependerá da gravidade do defeito e do meio ambiente a que a lata é exposta, isto porque a maioria das conservas são imersas em tanques com água para o seu arrefecimento após tratamento térmico. Assim, o número de microrganismos na água de arrefecimento será importante na determinação da recontaminação (Ray, 2004; Evancho *et al.*, 2009)..

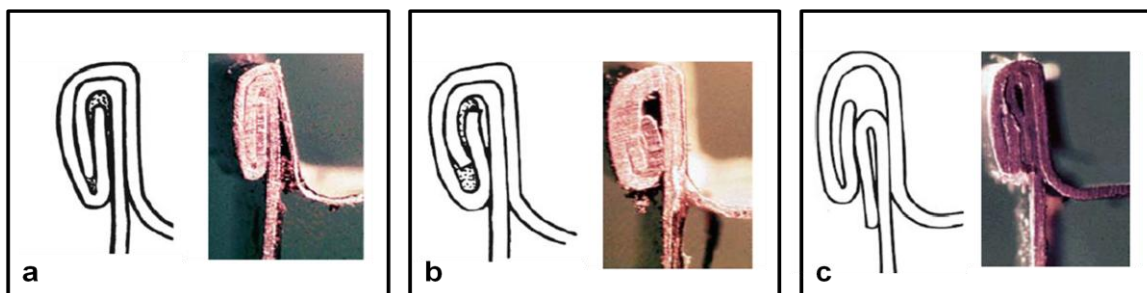


Figura 2.5 Diagramas e fotografias de latas sem defeitos (a) e com defeitos de cravação (b e c), em que **a)** Lata com “costura” normal; **b)** Lata com “costura” solta; **c)** Lata com “costura” falsa (adaptado de Evancho *et al.*, 2009)

A par do exemplo acima descrito, é importante ainda referir os problemas que advêm de um processamento térmico inadequado. Quando tal acontece, os microrganismos deterioradores e patogénicos não são destruídos, resultando, por exemplo, na sobrevivência dos esporos de *Clostridium* e *Bacillus* spp. Após o processamento, podem germinar e crescer, e causar deterioração. A deterioração envolve a quebra de hidratos de carbono ou proteínas, em que, por exemplo, *Clostridium* spp., *C. butyricum* e *C. pasteurianum*, fermentam os hidratos de carbono, produzindo ácidos voláteis e gases (H_2 e CO_2), e desta forma, provocam o inchaço da lata. Espécies proteolíticas como *C. sporogenes* e *C. putrefaciens*, metabolizam as proteínas e produzem H_2S (mau-cheiro), mercaptanos, indol, escatol, amoníaco, bem como o CO_2 e H_2 . Adicionalmente, esporos de *Bacillus* spp. anaeróbios facultativos, resistentes à temperatura de esterilização, como *B. subtilis* e *B. coagulans* também se podem desenvolver e produzir gás (CO_2). Por outro lado, a enterotoxina estafilocócica é uma toxina produzida por *Staphylococcus aureus*, extremamente resistente ao calor, não sendo inativada pelo processamento térmico. O desenvolvimento deste microrganismo e, consequentemente a produção de enterotoxinas, pode estar correlacionado, por exemplo, com más práticas de higiene por parte dos manipuladores, nas etapas da linha de produção em que a tarefa é realizada manualmente (Evancho *et al.*, 2009; Codex Alimentarius, 1979; Svenier *et al.*, 2012; André *et al.*, 2013).

Sabendo que a germinação dos esporos pode ocorrer a temperaturas elevadas (igual ou superior a $43^\circ C$), e o seu crescimento a temperaturas mais baixas (igual ou

superior a 30°C), os produtos esterilizados devem ser adequadamente arrefecidos (preferencialmente abaixo de 40-43°C) após o processamento térmico, e mantidos abaixo de 35°C durante o armazenamento subsequente, a fim de evitar a deterioração por microrganismos termófilos esporulados (Evancho *et al.*, 2009).

2.5.2.1 Principais microrganismos deterioradores

Não é possível descrever completamente todos os microrganismos que são responsáveis pela perda de qualidade de alimentos enlatados. Será feita uma breve referência aos tipos de microrganismos que mais contribuem para a deterioração de conservas de peixe, resumida na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 Principais microrganismos e respectivas manifestações de deterioração em produtos enlatados ácidos e de baixa acidez (adaptado de Landry *et al.*, 2001; Jay *et al.*, 2005)

	Tipo de microrganismo	Aparência da lata	Condição do produto
Produtos ácidos	<i>B. thermoacidurans</i>	Lata “plana”; ligeira alteração das condições de vácuo	Ligeira alteração do pH; odor e sabor desagradável
	Anaeróbios produtores de ácido butírico	Lata inchada	Odor a fermentado ou ácido butírico
	Não formadores de esporos	Lata inchada	Odor ácido
Produtos de baixa acidez	“Flat sour”	Lata “plana”; possível perda de vácuo no armazenamento	Aspeto geralmente não alterado; diminuição do pH; odor ligeiramente anormal
	Termófilos anaeróbios	Lata inchada	Odor a fermentado, azedo ou ácido butírico
	Produtores de H ₂ S	Lata “plana”; H ₂ S absorvido pelo produto	Escurecimento; odor a “ovo podre”
	Anaeróbios putrefativos	Lata inchada	Aumento do pH; odor a pútrido
	Aeróbios esporulados	Lata “plana”; algum inchaço em carnes curadas	Coagulação proteica

♦ **Mesófilos aeróbios esporulados**

Os mesófilos aeróbios esporulados mais comuns na deterioração de conservas são algumas estirpes de *Bacillus*, nomeadamente *B. sporothermodurans*. Como já foi referido anteriormente, a presença deste tipo de organismos está relacionada com o incorreto tratamento térmico adotado na etapa de esterilização (Evancho *et al.*, 2009).

♦ **Mesófilos anaeróbios esporulados**

Neste contexto, devem ser tidos em consideração dois grupos de mesófilos anaeróbios esporulados com maior importância: o grupo constituído por *Clostridium sporogenes*, estirpes proteolíticas de *C. botulinum* e outros microrganismos resistentes ao calor ("anaeróbios de putrefação"); e o grupo suportado por *C. perfringens*, estirpes não-proteolíticas de *C. botulinum* e anaeróbios produtores de ácido butírico (por exemplo, *C. butyricum*, *C. pasteurianum*) (Evancho *et al.*, 2009).

Na verdade, o primeiro grupo referido é o que apresenta primordial preocupação na deterioração de alimentos enlatados de baixa acidez. É sabido que o processo de enlatamento proporciona o ambiente anaeróbico ideal para a sua germinação e crescimento. A deterioração por estes anaeróbios é caracterizada, na maioria dos casos, pela produção de gás (acompanhada pelo inchamento da lata), pela redução do pH do produto, e desenvolvimento de odor pútrido, daí o nome genérico de "anaeróbios de putrefação" (Landry *et al.*, 2001; Jay *et al.*, 2005; Evancho *et al.*, 2009).

Do segundo grupo atrás mencionado, é importante fazer referência aos mesófilos anaeróbios esporulados produtores de ácido butírico, bem como de CO₂ e H₂. Os esporos destes organismos são capazes de germinarem e crescerem em valores de pH tão baixos como 4,2 - 4,4 e, como tal, são microrganismos de importância no que respeita à deterioração de alimentos ácidos. A título de exemplo, *C. butyricum* e *C. pasteurianum* são os anaeróbios produtores de ácido butírico mais comuns (Jay *et al.*, 2005; Evancho *et al.*, 2009).

♦ **Mesófilos acidúricos produtores de esporos e associados a latas sem abaulamento**

Estes microrganismos são anaeróbios facultativos formadores de esporos, não estando associados à formação de gás, em que a lata permanece "plana" (daí o termo "flat sour"). Por exemplo, *Bacillus coagulans* está relacionado com a deterioração de alimentos enlatados considerados ácidos (pH mínimo para o seu desenvolvimento igual a 3,8) (Landry *et al.*, 2001; Jay *et al.*, 2005; Evancho *et al.*, 2009).

♦ **Termófilos acidúricos produtores de esporos e associados a latas sem abaulamento**

Bacillus stearothermophilus é descrito como sendo um microrganismo termófilo esporulado não produtor de gás, responsável, também, pela deterioração de enlatados, cujo pH mínimo para o seu crescimento é de 5,3. Tal como os "aciduric flat sour sporeformers", mesmo ocorrendo deterioração, a lata permanece "plana". São organismos que deterioram uma vasta gama de produtos processados termicamente,

incluindo os ácidos e de baixa acidez. Os esporos produzidos são altamente resistentes ao calor, no entanto não produzem toxinas, pelo que não são preocupantes ao nível de saúde pública (Landry *et al.*, 2001; Ray, 2004; Jay *et al.*, 2005; Evancho *et al.*, 2009).

♦ **Termófilos anaeróbios esporulados**

Entre os microrganismos termófilos anaeróbios esporulados, existem os produtores e não produtores de sulfureto de hidrogénio (H_2S). *Desulfotomaculum nigrificans* (anteriormente conhecido como *Clostridium nigrificans*) é um termófilo anaeróbio que produz sulfureto de hidrogénio, crescendo em alimentos de baixa acidez, sendo 5,6 o valor de pH mínimo para a sua multiplicação. É o único organismo de redução de enxofre que tem sido associado à deterioração de alimentos processados termicamente. De facto, tem a capacidade de reduzir sulfatos, sulfitos, e outros compostos de enxofre redutíveis que produzem sulfureto de hidrogénio. Os esporos de *D. nigrificans* são altamente resistentes ao calor e podem sobreviver em processos típicos de esterilização comercial, mas devido às suas exigências anaeróbicas, de temperatura e pH a sua probabilidade de desenvolvimento é mínima. Adicionalmente, só um nível muito elevado de esporos juntamente com elevadas temperaturas de pós-processamento potencia a deterioração do produto (Landry *et al.*, 2001; Ray, 2004; Jay *et al.*, 2005; Evancho *et al.*, 2009).

De entre os termófilos não produtores de sulfureto de hidrogénio, o *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (também conhecido como *Clostridium thermosaccharolyticum*) é tido como um dos mais importantes. Consiste num anaeróbio obrigatório, cujos esporos, quando presentes no produto, produzem CO_2 e H_2 , juntamente com ácido acético, butírico, láctico, succínico e etanol. O pH ótimo para o seu crescimento é entre 6,2 - 7,2, mas algumas estirpes podem mesmo desenvolver-se a valores de 4,1 (Ray, 2004; Jay *et al.*, 2005; Evancho *et al.*, 2009).

♦ **Fungos termoresistentes**

Contrariamente à maioria dos fungos, existe um grupo cujas características lhes permitem ser resistentes ao calor, conhecidos como fungos termoresistentes. Os que têm sido associados à deterioração de alimentos enlatados são os *Byssoschlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces* e *Eupenicillium*. Este grupo de microrganismos têm sido isolados, principalmente de frutos e produtos à base de frutos enlatados. Possuem diversas características únicas que lhes permitem crescer em alimentos processados termicamente. Além de que, *B. fulva* e *B. nivea*, em particular, têm a capacidade de se desenvolverem em condições com níveis de oxigénio muito baixos (Kotzekidou, 1997; Evancho *et al.*, 2009).

♦ ***Microrganismos não formadores de esporos***

A presença destes microrganismos em alimentos enlatados significa que o tratamento térmico não foi suficiente ou ocorreu uma contaminação após processamento. Em alimentos de baixa acidez não é normal o seu aparecimento, enquanto que em alimentos ácidos, onde o processo térmico aplicado é menos intenso, já é mais recorrente a sua presença. Leveduras, fungos, bactérias Gram positivas (por exemplo, bactérias produtoras de ácido láctico), e bactérias Gram negativas (por exemplo, *Enterobacter* e *Pseudomonas*), são exemplos de microrganismos não formadores de esporos que podem desenvolver-se em produtos enlatados (Jay *et al.*, 2005; Evancho *et al.*, 2009).

Capítulo 3

Métodos para a Avaliação do Prazo de Validade

No presente capítulo serão abordadas as metodologias analíticas utilizadas na determinação do prazo de validade de diferentes produtos alimentares. Visto que na literatura são relatados poucos estudos acerca da avaliação do prazo de validade após abertura de alimentos enlatados, considerou-se pertinente fazer uma abordagem generalizada aos métodos microbiológicos, físicos, químicos e sensoriais onde se pudesse enquadrar este tipo de estudo. É crucial a avaliação do prazo de validade do produto após a sua abertura, na medida em que, na maioria dos casos, é acompanhado por um decréscimo da sua qualidade, como já foi abordado no Capítulo 1.

3.1 Análise Microbiológica

Os alimentos podem conter e ser veículos de diferentes microrganismos e seus metabolitos (bactérias e suas toxinas, vírus, parasitas, fungos e micotoxinas) (Ray e Bhunia, 2008a). Tal como referido no Capítulo 1, a interação de diversos fatores intrínsecos (ex: pH, a_w , potencial oxidação-redução) e extrínsecos (ex: tempo e temperatura de armazenamento, humidade relativa) ao alimento poderão determinar as condições ótimas de crescimento para a sobrevivência e multiplicação de um ou mais grupos destes microrganismos (Kilcast e Subramaniam, 2000; Valero *et al.*, 2012).

Ainda neste contexto, e a título de exemplo, após abertura da embalagem de um alimento pode ocorrer a contaminação do produto (com patogénicos ou deterioradores), devido à falta de higiene por parte do manipulador, ou falta de higiene dos próprios recipientes, além de condições de armazenamento inadequadas. Estas potenciais vias de contaminação podem ser muito variáveis e difíceis de controlar, na medida em que as práticas de higiene e conservação variam de consumidor para consumidor (Willock *et al.*, 2004).

3.1.1 Importância da Análise Microbiológica

A aceitabilidade de um alimento passa pela avaliação de diferentes critérios microbiológicos, sendo definida pelo Codex Alimentarius (1997) “*com base na presença ou ausência, ou no número de microrganismos, incluindo parasitas, e/ou a quantidade das suas toxinas/metabolitos, por unidade(s) de massa, volume, área ou lote*”. Os critérios microbiológicos estabelecem objetivos e pontos de referência para orientar os operadores das empresas do sector alimentar e as autoridades competentes nas suas atividades de gestão e de monitorização da segurança dos géneros alimentícios. A sua descrição inclui os microrganismos relevantes e/ou as suas toxinas/metabolitos

(patogénicos, de alteração ou indicadores), métodos analíticos para a deteção e/ou quantificação de diferentes microrganismos, plano de amostragem, limites microbiológicos e número de unidades de análise que deve estar em conformidade com estes limites (Codex Alimentarius, 1997).

Estes critérios podem dividir-se em critérios de Segurança e de Qualidade e podem ser aplicados a produtos crus, ingredientes ou alimentos prontos a comer em qualquer fase da cadeia alimentar (Gomes, 2007). Recorre-se normalmente a critérios microbiológicos pré-estabelecidos, nomeadamente Leis e Regulamentos (de cumprimento obrigatório), Especificações Microbiológicas (garantir a qualidade e segurança do produto até à data limite de consumo) e Valores Guia (estabelecem as linhas de orientação para a avaliação da qualidade microbiológica) (INSA, 2005). Além disso, e segundo o Regulamento (CE) n.º2073/2005, os estudos aplicados para a verificação do cumprimento dos critérios incluem, também, *“a consulta da literatura científica disponível e dos dados de investigação relativos às características de crescimento e sobrevivência dos microrganismos em questão”*.

Os grupos de microrganismos que devem ser incluídos numa análise microbiológica incluem os patogénicos e deterioradores, previamente mencionados, assim como microrganismos indicadores. A escolha do tipo de microrganismos a analisar deverá estar adequada e ser relevante para o alimento em estudo e tecnologia do processamento alimentar aplicado ao produto (Codex Alimentarius, 1997).

3.1.2 Métodos Microbiológicos

As técnicas comumente utilizadas na análise microbiológica para a determinação do prazo de validade têm por base os métodos clássicos da microbiologia como a contagem de microrganismos totais e microrganismos específicos característicos do alimento em análise, segundo critérios microbiológicos (Rodrigues *et al.*, 2011). Consoante o género alimentício e o tipo de alteração tecnológica a que este foi submetido na etapa de processamento, podem existir microrganismos suscetíveis de se desenvolverem, devendo adequar-se a análise microbiológica.

Habitualmente, o período de estudo em que se avalia a deterioração do alimento por ação dos microrganismos é determinado por meio do armazenamento do produto em condições estabelecidas para a sua conservação, avaliando a carga microbiana em intervalos de tempo definidos (Kilcast e Subramaniam, 2000). Podem ser realizados testes microbiológicos em condições ideais, condições médias e condições extremas de armazenamento (Valero *et al.*, 2012). Também podem ser utilizados testes de desafio para determinar a probabilidade do crescimento de microrganismos específicos, semelhantes ao teste microbiológico adotado no ensaio de armazenamento atrás

menção mas, neste caso, são inoculados microrganismos patogénicos ou de deterioração seleccionados diretamente nos alimentos a estudar (Kilcast e Subramaniam, 2000; NSWFA, 2010) permitindo avaliar a sua capacidade de sobrevivência ou taxa máxima de crescimento em diversas condições de armazenamento (Valero *et al.*, 2012, Regulamento (CE) n.º2073/2005). Esta vertente de análise microbiológica é aplicada sobretudo a alimentos que podem suportar o crescimento de microrganismos patogénicos, armazenados à temperatura de refrigeração ou ambiente. Por sua vez, não é muito usual a realização de estudos de desafio em alimentos congelados, pelo facto da temperatura utilizada para a sua conservação não possibilitar o crescimento microbiano. O mesmo acontece com alimentos submetidos à esterilização, como os produtos enlatados (FAO/WHO, 2003).

Os modelos preditivos têm sido cada vez mais aplicados à análise do comportamento microbiano no estudo do prazo de validade (Baranyi e Roberts, 1995). A estratégia preditiva, já descrita no Capítulo 1, é um dos métodos indiretos adotados no estudo do prazo de validade, que recorre a modelos matemáticos para calcular o crescimento dos microrganismos sob condições definidas. É uma abordagem que depende do conhecimento das propriedades do produto e das alterações decorrentes da deterioração, para que sejam fornecidos dados para os cálculos matemáticos (McMeekin *et al.*, 2002). Esta abordagem é “sustentada” por modelos primários que descrevem a cinética do processo (crescimento ou sobrevivência/inativação) e modelos secundários que permitem prever as mudanças nos parâmetros dos modelos primários (por exemplo, taxa de crescimento dos microrganismos em função dos fatores intrínsecos e extrínsecos). Programas de computador específicos permitem facilmente a realização dos cálculos matemáticos complexos envolventes a esta estratégia preditiva (Valero *et al.*, 2012). Na verdade, consiste numa metodologia que permite estudar o comportamento microbiano em diferentes condições físico-químicas, prever as consequências microbiológicas no período de armazenamento, sendo estas as principais vantagens da sua aplicação (Neumeyer *et al.*, 1997).

Nos últimos anos, a abordagem convencional dos métodos microbiológicos tem vindo a sofrer algumas alterações, nomeadamente com o desenvolvimento de procedimentos que incluem testes rápidos para a análise da deterioração por ação dos microrganismos. Estas novas técnicas podem ser divididas em dois grandes grupos: enumeração e presença/ausência (Ellis e Goodacre, 2001; Gracias e McKillip, 2004).

Relativamente aos métodos rápidos de enumeração é de realçar aqueles que se baseiam na microscopia, na bioluminescência de ATP, e na medição de fenómenos elétricos. As técnicas microscópicas envolvem a coloração (corantes fluorescentes) e posterior visualização num microscópio de epifluorescência. A introdução da técnica de

filtro de epifluorescência permitiu ultrapassar o problema da coloração inicial de células viáveis e não viáveis. Mesmo assim, apresenta como inconveniente o facto de ser um método demorado e trabalhoso, mas que pode ser ultrapassado com o desenvolvimento de sistemas automatizados e a utilização da técnica de citometria de fluxo, apesar de ser necessário entre 18 a 20 horas para se obter os resultados dos microrganismos que se encontram em baixos níveis nas amostras de alimentos. No que toca ao método baseado na bioluminescência de ATP a determinação é realizada por quantificação dos níveis de ATP em células bacterianas em cultura. Como o ATP é a fonte primária de energia das células vivas e também está presente nas próprias amostras de alimentos, é fundamental que a medição do ATP correspondente à atividade microbiana pressuponha a eliminação do ATP contido nas amostras. Por conseguinte, este método é recomendado na avaliação de superfícies e equipamentos da indústria alimentar possivelmente contaminados. As técnicas que têm por base a deteção da corrente elétrica no decorrer do crescimento microbiano também são exemplo de métodos de enumeração. Esta corrente elétrica é resultante de variações provocadas pela metabolização de partículas sem carga elétrica por ação de bactérias, incrementando um aumento na condutividade do meio (Ellis e Goodacre, 2001; Gracias e McKillip, 2004).

Paralelamente aos métodos de enumeração, os métodos de deteção também são exemplo de técnicas rápidas na análise microbiológica. Têm por base procedimentos baseados em métodos imunológicos, em que anticorpos reagem com antigénios presentes na superfície de microrganismos específicos. A técnica de imunoabsorção enzimática (ELISA) é a mais comum na determinação imunológica, e consiste na utilização de um marcador de enzima para a deteção de microrganismos patogénicos de origem alimentar, como por exemplo: *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter* spp, *Bacillus cereus*, assim como as toxinas produzidas por *Staphylococcus aureus* e proteases resultantes de espécies que pertencem ao género *Pseudomonas* (Ellis e Goodacre, 2001; Gracias e McKillip, 2004). Além dos métodos imunológicos, os procedimentos baseados em ácidos nucleicos também são considerados métodos de deteção, em que pequenos segmentos de ácido nucleico complementar de cadeia simples utilizados como sondas são aplicados para detetar sequências genéticas específicas (DNA – ácido desoxirribonucleico, ou RNA – ácido ribonucleico) de microrganismos nas amostras alimentares a avaliar. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é o método de deteção de ácido nucleico mais adotado, que visa a identificação rápida e seletiva de microrganismos presentes em diferentes matrizes, por amplificação de fragmentos de genes específicos e posterior avaliação em gel de eletroforese. Por sua vez, tem como desvantagens o facto do DNA de microrganismos não viáveis levar a resultados falsos positivos (por exemplo, células que

perderam a capacidade de expressar genes podem retornar a um estado cultivável), limitando o uso de PCR no controlo microbiológico de amostras alimentares, uma vez que células não viáveis são comuns em alimentos processados. Também pode haver a presença de inibidores de PCR no próprio alimento, encontrados por exemplo nos queijos, que influenciam negativamente a viabilidade do método. Outra limitação deste método é o fator tempo, que apesar de ser considerado um método rápido, pode ser demorado quando é o caso de testes em grande escala em que a reação de preparação é bastante exigente (Ellis e Goodacre, 2001; Bleve *et al.*, 2003; Gracias e McKillip, 2004).

3.2 Análise Física

A análise das propriedades físicas consiste no estudo de parâmetros como a cor e a textura dos alimentos, apresentado a primazia de serem métodos rápidos e objetivos, que traduzem a percepção que o consumidor tem do produto e são geralmente utilizados como complemento a outras análises (Gómez e Lorenzo, 2012). Na verdade, os instrumentos de teste de textura e cor permitem detetar e quantificar determinados parâmetros físicos, que devem ser interpretados em termos de percepção sensorial (Szczeniak, 2002). Assim, a análise física complementa a análise sensorial, no que respeita a propriedades sensoriais do alimento avaliado, nomeadamente a cor e textura.

A textura pode ser definida como uma manifestação sensorial e funcional das propriedades estruturais, mecânicas e de superfície de um alimento percebidos por meios mecânicos e pelos sentidos da visão, audição, tato e sinestesia. É uma propriedade que pode ser avaliada por métodos sensoriais ou instrumentalmente pelo texturómetro (Sveinsdottir *et al.*, 2002; Szczeniak, 2002; Varela *et al.*, 2005).

A cor é um dos principais atributos que influencia a percepção do consumidor no que respeita à qualidade. A cor é definida pelos comprimentos de onda no espectro do visível detetados pelo ser humano (380-770nm). Tal como a textura, a cor é uma propriedade que pode ser avaliada instrumentalmente (Francis, 1995; MacDougall, 2002a; Pathare *et al.*, 2013).

Entre os diferentes espaços de cor existentes (por exemplo, CIEXYZ, CIEUVW, CIELUV), o CIELAB, definido pela “Commission Internationale de L’éclairage” – “CIE 1976 L*a*b* Uniform Colour Space”, é o mais usado e recomendado para a aplicação em matrizes alimentares. Consiste num sistema de coordenadas L* (representa a luminosidade que corresponde a uma escala entre o branco - 100, e o preto - 0), a* (representa a escala cromática entre o verde - valores negativos, e o vermelho - valores positivos) e b* (representa a escala cromática entre o azul - valores negativos, e o amarelo - valores positivos), (MacDougall, 2002b; Pathare *et al.*, 2013). Adicionalmente,

os valores obtidos através da diferença total de cor (ΔE^*), do chroma (C^*_{ab}) e do ângulo hue (h_{ab}) também fornecem informações adicionais, nomeadamente a relação entre a análise visual e numérica, a vertente quantitativa e a vertente qualitativa, respetivamente (Pathare *et al.*, 2013; Sant'Anna *et al.*, 2013). É importante ainda referir que o ângulo hue fornece valores correspondentes a um diagrama tridimensional, como é observado pelo olho humano, que varia de 0° (vermelho) a 90° (amarelo), e de 180° (verde) a 270° (azul) (Pathare *et al.*, 2013; Sant'Anna *et al.*, 2013).

3.3 Análise Química

Os testes químicos visam igualmente a deteção de possíveis alterações que podem ocorrer na qualidade do produto, definindo o seu prazo de validade. A deterioração química está na base das mudanças sensoriais, podendo ser induzidas pela luz, variações de temperatura, presença de iões metálicos, atividade enzimática, desenvolvimento microbiano, entre outras, no decorrer do processamento ou durante o armazenamento. A oxidação lipídica, a hidrólise proteica e dos polissacarídeos, o escurecimento enzimático e não enzimático são algumas das reações químicas e bioquímicas responsáveis pela deterioração da qualidade dos alimentos (Valero *et al.*, 2012).

A avaliação destas alterações permite determinar se um produto está próprio para consumo, recorrendo a análises específicas para cada alimento e respetivos máximos legais, no caso em que este está definido. Simultaneamente, estas análises são da maior importância para a determinação do tempo de vida, pois permitem um acompanhamento da degradação do alimento com o tempo, ou até mesmo avaliar a velocidade de degradação e estimar o momento de rejeição por métodos indiretos. As análises químicas têm usualmente uma maior sensibilidade do que a obtida na análise sensorial (Valero *et al.*, 2012). A seguir referem-se algumas das determinações químicas mais comuns.

3.3.1 Potencial Hidrogeniónico (pH) e Acidez Titulável

O pH é um parâmetro de avaliação química que utiliza instrumentos de medida, permitindo uma rápida caracterização do produto em termos de concentração do ião H^+ . O pH de cada alimento é variável, sendo naturalmente mais baixo em produtos como frutos e vegetais, e mais alto em carnes e peixes. Este será função da razão de ácidos e bases presentes na amostra mas também do tipo de ácidos, dado que apenas os ionizados (função do seu pK) é que serão avaliados pelo elétrodo de pH (Sadler e Murphy, 2010). Durante a degradação de alimentos cárneos é usual ocorrer hidrólise

proteica, fermentação láctica ou acética, etc. originando uma diminuição do pH. Já no que respeita ao peixe, e de acordo com Howgate (2009), após a fase do *rigor mortis*, e dependendo das condições de armazenamento, o valor do pH usualmente aumenta, principalmente porque o teor em glicogénio é muito baixo e os principais produtos de degradação são aminas. No entanto, a alteração do pH é uma consequência da concentração de ácidos e bases ionizados em solução e não uma medida da quantidade total de ácidos ou bases, conforme referido. Se a avaliação do pH pode ser uma forma prática e rápida de avaliar, por exemplo, o aumento da acidez, apenas a avaliação efetiva da quantidade de ácidos livres será real.

Assim, a determinação da Acidez Titulável é também um parâmetro muito utilizado, dando uma estimativa mais real dos ácidos totais na amostra e sendo expressa na quantidade de solução alcalina necessária para neutralizar os ácidos em solução. Implica, obviamente, uma extração desses mesmos ácidos para uma solução de forma a poder executar a titulação, bem como a visualização do ponto final da reação, recorrendo a indicadores corados adequados ou mesmo a um elétrico de pH, sendo por isso mais complexa analiticamente do que a simples avaliação do pH (Sadler e Murphy, 2010). Pode ser utilizada, por exemplo, para acompanhar o amadurecimento de frutas, onde ocorre formação de ácidos orgânicos por degradação dos açúcares livres (Varela *et al.*, 2005). A acidez pode aumentar também pela libertação de ácidos gordos livres, sendo um indicador de hidrólise lipídica.

3.3.2 Azoto Básico Volátil Total (ABVT) e Trimetilamina (TMA)

O Azoto Básico Volátil Total (ABVT) e a Trimetilamina (TMA) são índices de deterioração de produtos de pesca e, por isso, são comumente aplicados a estudos que envolvam este tipo de matriz alimentar (Howgate, 2009; Hocaoglu *et al.*, 2012).

As bases voláteis totais nitrogenadas constituem um parâmetro indicativo para avaliação do grau de frescura do pescado. A sua determinação inclui a medição da TMA (resultante da deterioração microbiana do óxido de trimetilamina - OTMA), dimetilamina (produzida por enzimas autolíticas durante o armazenamento), amoníaco (produzido por desaminação dos aminoácidos e nucleótidos) e algumas aminas de baixa massa molecular resultantes da descarboxilação de aminoácidos (Özoğul e Özoğul, 2000; Howgate, 2009).

A TMA é uma amina volátil que permite avaliar a frescura dos alimentos, na medida em que confere odor característico a peixe em deterioração ou a amoníaco, consoante a concentração em que este se encontra no alimento (Evangelista *et al.*, 2000; Sallam, 2007; Howgate, 2009; Hocaoglu *et al.*, 2012). Esta amina resulta maioritariamente da degradação microbiana do OTMA, um importante regulador da

pressão osmótica presente nos tecidos de muitos peixes marinhos. As bactérias contaminantes utilizam o OTMA como aceitador de elétrons, regenerando assim o NADH a NAD^+ . Verifica-se um acréscimo de TMA aquando de um aumento de bactérias específicas de deterioração: *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum* e *Vibrionaceae*. Apesar da determinação deste parâmetro não expressar as fases primárias de deterioração e apenas ser realizado em algumas espécies marinhas, permite ser efetuado de forma rápida e normalmente reflete com maior precisão o grau de deterioração, em comparação com as contagens microbianas (Huss, 1995c; Howgate, 2009).

Para além da formação de TMA ocorre igualmente formação de dimetilamina, e formaldeído. Sendo em todos os casos o OTMA um dos substratos comuns, a sua concentração inicial no peixe fresco, poderá também condicionar o incremento nas aminas. A amónia encontra-se naturalmente presente em pequenas quantidades no músculo do peixe e resulta da desaminação bacteriana das proteínas, péptidos e aminoácidos.

O ABVT corresponde à quantidade de bases azotadas voláteis existente no peixe e é expressa na quantidade equivalente de azoto (N), em miligramas por cada 100 gramas de produto (Kilinc e Cakli, 2005). É empregado na avaliação do índice de deterioração de certos alimentos e permite a quantificação das bases voláteis totais nitrogenadas referidas anteriormente resultantes da degradação proteica (Sallam, 2007; Hocaoglu *et al.*, 2012). No peixe fresco varia usualmente entre 10 e 15mg N/100g de peixe, exceto para peixes pelágicos como a sardinha (16-18mg N/100g) (El-Marrakchi *et al.*, 1990) ou até 30mg N/100g no atum *albacore* (Perez-Villarreal e Pozo, 1990). O aumento com o tempo de refrigeração reflete a produção de aminas por processos autolíticos.

A avaliação do ABVT tem sido cada vez mais usual na determinação de deterioração dos produtos da pesca, uma vez que se trata de um método com um procedimento analítico simples e exige baixo nível de recursos necessários para a sua quantificação (Howgate, 2009). O Regulamento (CE) nº1022/2008 da Comissão, de 17 de Outubro de 2008, que altera o anterior Regulamento (CE) nº2074/2005 no que se refere aos limites de ABVT, determina o limite de azoto básico volátil total (ABVT) para algumas categorias de peixe fresco.

No que respeita aos métodos analíticos, de acordo com o Regulamento (CE) nº2074/2005, o método de referência a utilizar para o controlo dos limites de ABVT é o método de destilação de um extrato desproteínizado com ácido perclórico. Este método consiste na extração das bases azotadas voláteis da amostra com uma solução de ácido perclórico. Após a alcalinização, o extrato é submetido à destilação por arrastamento de

vapor, sendo os componentes de base volátil absorvidos por um ácido recetor e o ácido excedente titulado para avaliação das bases absorvidas, sendo expresso em mg de N/100g de amostra. No mesmo regulamento, são também enumerados outros métodos possíveis, todos eles bastante antigos, tais como: método de microdifusão de Conway e Byrne (1933), método de destilação direta descrito por Antonacopoulos (1968) e o método de destilação de um extrato desproteínizado com ácido tricloroacético [Comité do Codex Alimentarius para o peixe e produtos de pesca (1968)]. Pela análise de alguns artigos científicos em peixe foi possível verificar que estas metodologias continuam a ser utilizadas (Kilinc e Cakli, 2005; Sallam, 2007; Elías e Carrascosa, 2010; Hocioğlu *et al.*, 2012).

Contudo, a avaliação da TMA ou do ABVT não podem substituir a avaliação organolética nem servirem como indicadores universais de qualidade de peixe. Contudo, permitem auxiliar na deteção de contaminações microbianas e constituem um ensaio relativamente simples.

3.3.3 Aminas Biogénicas

Na sequência das aminas anteriores, é importante referir as aminas ditas biogénicas, formadas por descarboxilação de aminoácidos livres, aquando do armazenamento ou processamento dos produtos, pelo tratamento térmico ou por ação microbiana (Huss, 1995c; Önal, 2007; Hu *et al.*, 2012). É sabido que as aminas biogénicas são bases orgânicas com estrutura alifática (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina), aromática (tiramina, feniletilamina) ou heterocíclica (histamina, triptamina). Algumas aminas biogénicas podem estar naturalmente presentes em diversos alimentos em baixas concentrações, como é o caso das frutas, legumes, leite, carne e peixe. Contudo, em produtos fermentados como o queijo, o vinho e a cerveja, estão em concentrações elevadas, nomeadamente a tiramina (Huss, 1995c; Önal, 2007). Do ponto de vista da quantificação de aminas biogénicas em alimentos, o peixe é o produto mais estudado, principalmente pela possível presença de histamina, seguido da carne, vinho, queijo e cerveja (Erim, 2013).

A determinação dos teores de aminas biogénicas nos alimentos é importante, pois para além de algumas possuírem efeitos fisiológicos e uma atividade bioativa importante (histamina, serotonina, dopamina, tiramina), desempenham um papel importante como marcador do nível de contaminação microbiológica, e podem também estar na origem de intoxicações alimentares, devido à sua toxicidade potencial, em particular a histamina (Önal, 2007; Prester, 2011; Visciano *et al.*, 2012).

O teor de aminas biogénicas no peixe depende em parte do teor em aminoácidos livres que, por sua vez, é característico da espécie e da presença e atividade de descarboxilases, e logo de fatores que condicionam o crescimento microbiano e a atividade enzimática como a temperatura, tempo, pH, presença de sal, disponibilidade de oxigénio e competição com outros microrganismos contaminantes. Em particular, os peixes ricos em histidina, usualmente os de pele escura como o atum e a sardinha, apresentam naturalmente uma maior tendência para formação de histamina e por isso requerem um controlo mais apertado (FDA, 2011; FAO/WHO, 2012).

Como tal, têm sido sugeridos limites máximos para a presença de aminas biogénicas em vários alimentos. A título de exemplo, de acordo com a União Europeia (Diretiva do Conselho 91/493/CEE de 21 de Julho de 1991), em peixes da família *Scombridae* (por exemplo, atuns e cavala) e *Clupeidae* (por exemplo, sardinhas) o nível máximo de histamina era de 100mg/kg. Segundo o Regulamento (CE) nº1441/2007 de 5 de Dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) nº2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, para produtos de pesca de espécies de peixes associadas a um elevado teor de histidina, nomeadamente os das famílias enumeradas anteriormente, o limite máximo é de 100-200mg/kg. Adicionalmente, a FDA (2011) relata que o nível máximo de histamina no peixe é de 50mg/kg.

Para além da histamina é usual encontrarem-se referências ao teor em aminas biogénicas totais. Importa contudo distinguir que nem todas as aminas biogénicas poderão ser interessantes do ponto de vista do controlo da frescura ou contaminação do produto. Na verdade, as poliaminas como a espermidina e a espermina encontram-se naturalmente presentes em muitos produtos, inclusive de origem vegetal sem qualquer impacto na qualidade do produto final do ponto de vista de segurança e qualidade alimentar (Veciana-Nogués *et al.*, 1997). Assim, encontram-se descritos alguns Índices que permitem associar as aminas biogénicas de maior importância no controlo de frescura. O chamado “índice de aminas biogénicas”, por exemplo, corresponde à soma da putrescina, cadaverina, tiramina e histamina e encontram-se valores de referencia na literatura para peixe fresco, bem como para os limites após conservação (Prester, 2011).

Relativamente às metodologias analíticas utilizadas para a sua determinação, dada a diversidade química entre todas as aminas biogénicas, têm sido desenvolvidos vários métodos para a sua avaliação, nomeadamente por cromatografia, desde cromatografia de camada fina (TLC), cromatografia gasosa (GC), eletroforese capilar (CE) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Önal, 2007; Erim, 2013). Conforme verificado em literatura recente, o método mais usual para a quantificação das diversas aminas de forma individual é o HPLC, devido à sua sensibilidade, fiabilidade e reprodutibilidade (Özogul *et al.*, 2002).

É de salientar o facto de alguns métodos cromatográficos, nomeadamente por cromatografia gasosa, permitirem a avaliação simultânea das aminas voláteis anteriormente referidas e das biogénicas, o que poderá ser de interesse quando se estudam os mecanismos de degradação envolvidos e as especificidades da flora microbiana responsável (Önal, 2007). Nas indústrias é comum a utilização de testes rápidos para a histamina, recorrendo a *kits* usualmente com uma base em reação imunológica com deteção colorimétrica.

3.3.4 Degradação Lipídica

Os ácidos gordos, componentes principais das gorduras, estão sujeitos a processos de oxidação, principalmente quando o seu grau de insaturação é elevado, como ocorre no peixe. A avaliação do grau de oxidação da fração lipídica é assim um indicador do grau de deterioração do produto e pode ser utilizado para estimar o seu prazo de validade (Bandarra *et al.*, 1997; Chaijan *et al.*, 2006; Wheeler e Morrissey, 2008).

Os hidroperóxidos são os produtos primários da oxidação lipídica. Não apresentam odor nem sabor e não estando relacionados com a qualidade sensorial do produto mas podem ser detetados através de métodos químicos. Todavia, o índice de peróxidos pode ser um indicador potencial da formação posterior de compostos secundários de oxidação sensorialmente detetáveis pela evolução do processo oxidativo. Por outro lado, os hidroperóxidos são instáveis e decompõem-se com o tempo, pelo que um valor baixo de peróxidos num determinado momento da armazenagem tanto pode indicar uma fase inicial de autooxidação como uma fase tardia, como ocorre num produto oxidado em que a maioria dos hidroperóxidos se encontram degradados (Huss, 1995c; Shahidi e Zhong, 2005; Barriuso *et al.*, 2013).

Os produtos secundários da oxidação lipídica têm origem numa fase mais avançada da rancificação, como consequência da oxidação dos hidroperóxidos em aldeídos, cetonas e ácidos gordos de cadeia curta. A maioria destes compostos confere odores e sabores desagradáveis associados ao cheiro característico a ranço. No decorrer da oxidação lipídica, é formado também malondialdeído (MDA) a partir da hidrólise dos peróxidos cíclicos formados nos ácidos gordos com três ou mais ligações duplas. Este composto é altamente reativo e a sua determinação é um indicador usual de estados mais avançados de oxidação.

As metodologias para avaliação da degradação lipídica passam usualmente por uma extração prévia dos componentes lipídicos recorrendo a solventes orgânicos. Para verificar a composição em ácidos gordos e a sua alteração é usual recorrer à cromatografia gasosa, sendo possível verificar a alteração individual na quantidade de

cada ácido gordo. Estas metodologias, no entanto, são morosas e requerem equipamento específico. O mais usual é a avaliação do grau de oxidação lipídica recorrendo a métodos mais rápidos e que, apesar de não detalharem a identidade de cada componente oxidado, dão uma estimativa do grau de oxidação geral (Barriuso *et al.*, 2013).

A avaliação do índice de peróxido é uma dessas metodologias, e a maioria dos métodos oficiais para a determinação dos peróxidos baseia-se numa titulação iodométrica e exprime-se em milequivalentes por 1000 gramas de amostra a testar (Özogul *et al.*, 2005; Calligaris *et al.*, 2008).

Para avaliar os produtos secundários de oxidação é usual recorrer ao índice de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico, ou TBARS. Este índice é um dos métodos mais utilizado como indicador do grau de oxidação lipídica dos alimentos, nomeadamente do peixe (Hocaoğlu *et al.*, 2012; Barriuso *et al.*, 2013), onde é definido como a quantidade, em miligramas de MDA, por cada 1000 gramas de produto (Kilinc e Cakli, 2005; Patsias *et al.*, 2006). Nesta determinação o MDA, altamente reativo, reage com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formando um complexo corado rosa MDA-TBA, como pode ser comprovado pela observação da Figura 3.1, podendo ser medido por espectrofotometria a um comprimento de onda de 530-535nm. Por sua vez, os alcenos e alcadienos também podem reagir com o ácido 2-tiobarbitúrico, levando também à formação de cor rosa, sendo por isso mais correto denominar como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do que simplesmente teor em MDA conforme era usual (Shahidi e Zhong, 2005; Papastergiadis *et al.*, 2012; Barriuso *et al.*, 2013).

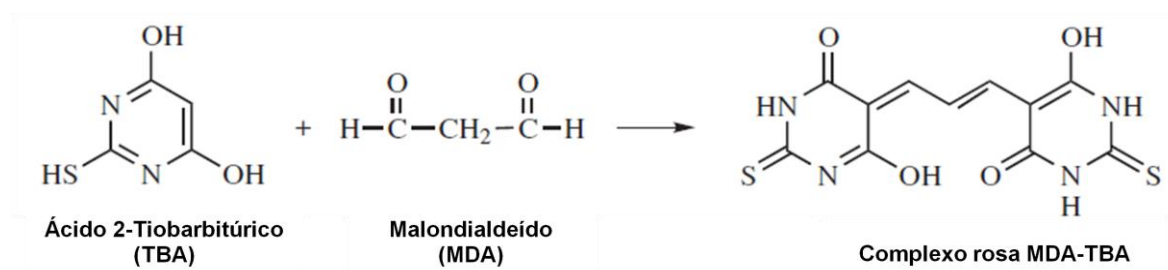


Figura 3.1 Reação do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) com o malondialdeído (MDA) (adaptado de Shahidi e Zhong, 2005)

3.4 Análise Sensorial

A componente sensorial é um fator chave na determinação do prazo de validade de diversos géneros alimentícios (Hough *et al.*, 2003). A análise sensorial, mesmo nas atuais condições de desenvolvimento da análise instrumental, continua a ser uma avaliação essencial, na medida em que se trata de um árbitro final da qualidade. Além

disso, é o único meio de avaliação de que o consumidor dispõe, e que permite responder a perguntas sobre a qualidade do produto, no que respeita à discriminação, descrição ou preferência (Hough *et al.*, 2003; Calle *et al.*, 2006). A medição instrumental por si só não é capaz de indicar a aceitação ou rejeição por parte do consumidor (Carpenter *et al.*, 2000; Kilcast e Subramaniam, 2000).

A avaliação sensorial é definida como uma disciplina científica que visa identificar, medir, analisar e interpretar as reações características do produto alimentar, perceptíveis através dos sentidos da visão, olfato, paladar e audição (Carpenter *et al.*, 2000; Calle *et al.*, 2006). O teste sensorial é concebido para validar o período de tempo que um determinado produto permanecerá com o nível de “qualidade aceitável”. Para determinados alimentos, o final do prazo de validade é determinado por alterações químicas/físicas que condicionam as alterações sensoriais, e finalmente a sua aceitação pelo consumidor (Kilcast e Subramaniam, 2000; Lawless e Heymann, 2010; Giménez *et al.*, 2012).

Utilizando os determinantes de qualidade de um produto, são padronizadas as especificações sensoriais e estabelecidos os limites de sensibilidade e aceitabilidade das características sensoriais. Na medida em que existem diferentes formas de realizar testes sensoriais no estudo do prazo de validade, os investigadores devem planear o estudo cuidadosamente (Kilcast e Subramaniam, 2000). O recurso a qualquer teste baseado numa análise sensorial requer um conjunto de procedimentos éticos, para que os riscos microbiológicos sejam minimizados, de maneira a garantir a proteção da saúde dos avaliadores. Assim, caso existam dúvidas relativamente à segurança das amostras a serem avaliadas, é importante que sejam realizados os testes microbiológicos previamente ao teste sensorial (Lawless e Heymann, 2010).

3.4.1 Métodos Sensoriais

O tempo e recursos financeiros inerentes à realização de uma análise sensorial no estudo do prazo de validade são dois pontos fundamentais a ter em consideração, a par da obtenção de resultados fiáveis e estatisticamente válidos. Estão descritas duas estratégias de armazenamento e avaliação dos produtos que podem ser usadas neste tipo de estudo: armazenamento básico e invertido (Hough, 2010a; Giménez *et al.*, 2012).

O armazenamento básico é o método mais utilizado e consiste na análise das características sensoriais de um conjunto de amostras do mesmo lote sob as condições normais e testá-las com diferentes tempos de armazenamento. A avaliação é feita por um painel de provadores treinados, tendo por base métodos de avaliação standardizados. Como inconveniente, é de realçar que os provadores ao terem consciência do objetivo do estudo podem deduzir que ocorre um aumento da deterioração da matriz alimentar em

causa com o decorrer do tempo, o que pode levar a resultados tendenciosos (Hough, 2010a; Giménez *et al.*, 2012).

O armazenamento invertido tem como ideia base avaliar as amostras no mesmo dia, com um tempo de armazenamento distinto, e tem a vantagem de superar os principais inconvenientes do armazenamento básico, na medida em que minimiza o tempo, esforço e recursos necessários para o desenvolvimento da experiência. Todavia, a estrutura do armazenamento invertido pode não ser a mais aconselhada, isto é, quando há dificuldade em armazenar as amostras em condições cujas alterações sensoriais não ocorrem ou ocorrem lentamente. Para a realização deste tipo de abordagem, é essencial que os lotes dos respetivos produtos sejam homogêneos ao longo de um determinado período de tempo, mas nem sempre isso é possível, pois é difícil garantir que durante o tempo de armazenamento de produtos frescos e perecíveis as condições de armazenagem minimizem os processos de deterioração (Hough, 2010a; Lawless e Heymann, 2010; Giménez *et al.*, 2012).

Giménez *et al.* (2012) descreveram as metodologias mais adequadas para a estimativa sensorial do prazo de validade. Trata-se de métodos baseados na qualidade, limite de aceitabilidade, metodologia de ponto de corte e análise de sobrevivência. A forma mais habitual de estimar sensorialmente o prazo de validade consiste na avaliação da qualidade do produto alimentar no decorrer do tempo de armazenamento, recorrendo a um painel de avaliadores treinados. O foco da análise sensorial não deverá incidir exclusivamente na deterioração do produto, mas também na rejeição do produto pelo consumidor. As metodologias baseadas no consumidor têm sido alvo de grande destaque em diferentes estudos, com o objetivo de incentivar os investigadores a fundamentar as determinações sensoriais do prazo de validade na percepção do consumidor.

3.4.1.1 Métodos baseados na Qualidade

Sob o ponto de vista deste método, o prazo de validade sensorial é definido como o tempo de armazenamento no qual a qualidade global ou a intensidade de um atributo sensorial específico compreende um valor pré-determinado ou “critério de falha”, assumindo o produto inadequado para consumo (Giménez *et al.*, 2012). Os diferentes tipos de abordagens sensoriais ao método baseado na qualidade são desenvolvidos nos seguintes tópicos:

- ◆ Numa primeira abordagem, a estimativa pode ser feita pela avaliação do grau de diferença de amostras armazenadas, comparativamente a um produto fresco, designado de amostra controlo. O painel de provadores treinados avalia esse grau de diferença utilizando testes discriminativos (testes de comparação pareada,

triangulares ou duo-trio) ou escalas de intensidade, em que a magnitude dessa mesma diferença é uma função do tempo de armazenamento e o prazo de validade é estimado como o período de tempo em que o produto atinge uma diferença pré-determinada a partir da amostra controlo. É determinado se existem diferenças significativas entre as amostras controlo e as armazenadas, através de testes binomiais (Lawless e Heymann, 2010; Giménez *et al.*, 2012). Ao desenvolver esta metodologia é imprescindível ter em consideração as condições de armazenamento a que é submetido o produto fresco, na medida em que este deve encontrar-se inalterado durante o tempo que permanece armazenado, isto é, as características sensoriais devem ser asseguradas (Patsias *et al.*, 2006; Giménez *et al.*, 2012).

♦ Alternativamente à metodologia anteriormente referida, o prazo de validade pode ser estimado sensorialmente pela medição da intensidade das características sensoriais no decorrer do armazenamento, ou seja, é vista como o tempo em que a intensidade de um atributo sensorial atinge um valor pré-determinado. A perceção, pelos provadores, da intensidade de uma ou mais sensações subjacentes ao produto em estudo é refletida numa escala numérica, sendo recomendado para esta finalidade a utilização de escalas não estruturadas. A etapa “chave” desta metodologia baseia-se na seleção dos atributos que melhor definem as alterações sensoriais ocorridas durante o armazenamento. Assim, com o objetivo de identificar possíveis defeitos decorrentes de um período de conservação prolongado, são apresentadas aos provadores amostras com diferentes tempos de armazenamento que enumerem os atributos que melhor identificam as diferenças entre as amostras. Posteriormente à etapa de seleção dos atributos, é realizado o treino do painel no que toca à intensidade dos atributos. Neste treino os provadores avaliam amostras com diferentes intensidades de cada atributo, assim como os potenciais padrões de referência. O prazo de validade sensorial de diferentes produtos tem sido estimado através da medição da intensidade de características específicas (Ares *et al.*, 2006; Giménez *et al.*, 2012).

♦ Adicionalmente, o Método do Índice de Qualidade (MIQ) retrata de uma forma clara a aplicação do método de avaliação da qualidade. Um exemplo é a metodologia que foi desenvolvida e adaptada para análise de peixe, e que se baseia na avaliação objetiva das principais características sensoriais, com um sistema de pontuação que varia entre 0 e 3 (a atribuição da menor pontuação equivale a uma maior frescura do peixe) (Bonilla *et al.*, 2007; Soares e Gonçalves, 2012). Trata-se de uma abordagem sensorial em que é necessário a definição das especificações e padrões da

qualidade. Além disso, requer um painel de provadores treinados para a avaliação da qualidade dos produtos através de uma escala, cujos pontos que a constituem sejam definidos pelos atributos sensoriais. Este painel deve ser capaz de recordar as características do produto, e as descrições correspondentes a cada ponto da escala, identificando possíveis defeitos que possam estar presentes no produto como consequência de um período de armazenamento prolongado, tendo como suporte a utilização de uma escala de qualidade que permita quantificar o nível de importância de cada defeito (Lawless e Heymann, 2010).

3.4.1.2 Metodologia do Limite de Aceitabilidade

As mudanças nas características sensoriais dos produtos são perceptíveis pelos consumidores. O desenvolvimento de estudos de consumo permite estabelecer critérios adequados para estimar sensorialmente o prazo de validade de diferentes produtos alimentares (Cardelli e Labuza, 2001). De acordo com a Metodologia do Limite de Aceitabilidade, baseada no consumidor, o prazo de validade sensorial pode ser considerado como o período de tempo durante o qual o produto é aceite pelo consumidor final, oferecendo o nível esperado de qualidade e a sua adequação para o uso pretendido. Nesta metodologia são apresentadas aos consumidores uma série de amostras com tempos de armazenamento diferentes para serem classificadas utilizando uma escala hedónica de 9 pontos. Seguidamente, é feito um diagrama de dispersão suportado pela média das classificações totais em função do tempo de armazenamento, e obtida uma regressão linear (Giménez *et al.*, 2012).

Segundo o critério proposto por Hough *et al.* (2002), o prazo de validade pode ser determinado como o tempo de armazenamento até que seja detetada, pelo consumidor, a primeira mudança significativa na aceitabilidade global. Pelo desenvolvimento deste método é possível garantir a qualidade do produto ao longo do seu prazo de validade, apesar de, em certos casos, ser um critério muito limitante a ser utilizado pelo fabricante do produto em causa, pois o prazo de validade determinado pode ser demasiado curto. O número de consumidores que é necessário recrutar para a avaliação dos produtos é um requisito crucial na metodologia do limite de aceitabilidade. Para a realização de testes hedónicos é recomendado um número entre 50-300 consumidores (Giménez *et al.*, 2007).

3.4.1.3 Metodologia de “Ponto de Corte”

A aplicação repetida de estudos do consumidor torna-se tediosa, demorada e cara (Hough, 2010a). Apesar da importância de estudos de consumo na estimativa sensorial

do prazo de validade, é mais fácil determinar a intensidade das características sensoriais por meio de medições analíticas ou instrumentais, sendo estas consideradas uma alternativa interessante e rentável para a estimativa do prazo de validade. Esta abordagem sensorial é designada por Metodologia de “Ponto de Corte” e é bastante simples quando aplicada, por exemplo, a produtos em que o prazo de validade é determinado pela textura ou pela cor. No entanto, o odor e sabor são atributos cuja monitorização por métodos analíticos das alterações decorrentes do tempo de armazenamento apresenta maior dificuldade (Giménez *et al.*, 2012).

A metodologia de “Ponto de Corte” baseia-se na correlação da intensidade da medição e o limite de aceitabilidade, e exige um único estudo do consumidor para a definição dos “critérios de falha” para a intensidade do atributo. Também há a possibilidade de realizar a avaliação sensorial com um painel de provadores treinados, ultrapassando, deste modo, a limitação em selecionar um “critério de falha” arbitrária. É relevante ter em consideração o facto de estarmos na presença de um método que pretende a identificação do atributo crítico por avaliação de diferentes tempos de armazenamento ou por armazenamento acelerado.

Hough (2010a) enumerou os seis passos básicos aplicados no desenvolvimento da metodologia de “Ponto de Corte”, nomeadamente: **(i)** a preparação do conjunto de amostras providas de um aumento da intensidade do defeito sensorial (através da utilização de diferentes lotes de produtos com tempos de armazenamento diferentes, do armazenamento acelerado, ou da modificação das amostras frescas por adição de diferentes concentrações de um composto de referência); **(ii)** a avaliação da intensidade do atributo crítico das respetivas amostras por um painel de provadores treinados; **(iii)** a determinação da aceitação do consumidor pelas diferentes amostras; **(iv)** a elaboração da regressão da aceitação global em função da intensidade do defeito sensorial; **(v)** a elaboração da regressão da intensidade do defeito sensorial em função do tempo de armazenamento; e **(vi)** a estimativa sensorial do prazo de validade.

3.4.1.4 Análise de Sobrevivência

Um novo conceito comumente aplicado a diferentes áreas, particularmente ao estudo do prazo de validade por avaliação sensorial, refere-se à Análise de Sobrevivência, que consiste no conjunto de procedimentos estatísticos para a análise de dados para os quais a variável resposta de interesse é o tempo até que um determinado acontecimento ocorra, ou seja, o tempo é o foco da análise. De facto, entre as diferentes alternativas para a determinação do prazo de validade tendo por base os dados do consumidor, a análise de sobrevivência é a abordagem recomendada, na medida em que

reflete de uma forma mais objetiva a preferência e aceitabilidade do produto. Apesar de ser uma metodologia recentemente desenvolvida, um grande número de estudos provaram a sua aplicabilidade numa ampla gama de produtos alimentares (Hough *et al.*, 2003; Hough, 2010b; Giménez *et al.*, 2012).

Considerando T o tempo de ocorrência de um evento ε , nos estudos de análise sensorial na avaliação do prazo de validade, este evento baseia-se na rejeição, pelo consumidor, do produto armazenado. Neste tipo de estudo, as amostras alimentares são apresentadas aos consumidores com diferentes tempos de armazenamento. T é uma variável, não negativa, cuja distribuição aleatória pode ser caracterizada pelas seguintes funções: Função de sobrevivência, $S(t)$; Função de falha, $F(t)$; Função probabilidade de densidade, $f(t)$; Função de perigo, $h(t)$. Por exemplo, ponderando T como o tempo de armazenagem em que o consumidor rejeitará a amostra, a função de sobrevivência ou de aceitação define-se como a probabilidade de aceitação pelos consumidores de um produto com tempo de armazenamento além do tempo t , que é $S(t) = P(T > t)$, definido para $t \geq 0$. É uma função monotonamente decrescente e, caso T seja contínuo, $S(t)$ é contínua e estritamente decrescente (Hough *et al.*, 2003; Hough, 2010b).

Aquando da avaliação do conjunto de amostras os consumidores são colocados perante a questão “Costuma consumir este produto?”, à qual devem responder “Sim” ou “Não”, consoante a sua preferência para o produto em análise. Os dados censurados são uma característica importante no estudo do prazo de validade, uma vez que fornecem apenas informação parcial da variável aleatória de interesse (Hough *et al.*, 2003; Calle *et al.*, 2006). A análise da Tabela 3.1 ajuda a compreender o que são dados censurados. Esta descreve o caso de os consumidores avaliarem seis amostras com um tempo de armazenamento diferente, e em que podem ocorrer três tipos de censura. Quando o consumidor rejeita a amostra no primeiro tempo de armazenamento considerado (t_1), o prazo de validade para o consumidor não se verifica, pois é inferior ao primeiro tempo de armazenagem ($T \leq t_1$), e os dados são censurados à esquerda. Por outro lado, se um consumidor aceita a amostra armazenada no tempo t_2 e a rejeita no tempo t_3 , o momento exato de rejeição da amostra corresponde ao prazo de validade e ocorre entre t_2 e t_3 ($t_2 < T \leq t_3$), sendo observada a censura intervalar. Por fim, se um consumidor aceita todas as amostras a partir de t_1 , não se verifica a rejeição, e o prazo de validade é, desta forma, superior ao último tempo de armazenamento considerado ($T > t_6$), em que os dados são censurados à direita (Hough *et al.*, 2003; Giménez *et al.*, 2012).

Tabela 3.1 Exemplo de uma matriz utilizada para a análise dos dados, através da análise de sobrevivência e do tipo de censura, onde “Sim” e “Não” significa que o consumidor aceitou e rejeitou a amostra, respetivamente (adaptado de Giménez *et al.*, 2012)

Consumidor	Tempo de Armazenamento						Censura
	t1	t2	t3	t4	t5	t6	
1	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Intervalo
2	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Direita
...
n	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Esquerda

Em resumo, quando o tempo de interesse é superior ao tempo observado, estamos na presença de dados censurados à direita; quando o tempo de interesse é inferior ao tempo observado verifica-se censura à esquerda. Na censura intervalar, o tempo de interesse sucede no intervalo observado (Hough *et al.*, 2003; Bastos e Rocha, 2006; Hough, 2010b).

A partir dos dados censurados, são definidos modelos paramétricos e não paramétricos, que permitem a estimativa do prazo de validade do produto em estudo (Hough *et al.*, 2003). Uma estimativa não-paramétrica da função de sobrevivência pode ser determinada pela função de probabilidade, sendo uma expressão matemática que descreve a probabilidade conjunta das observações dadas por um determinado número de consumidores. Como alternativa, os modelos paramétricos poderiam ser aplicados para obter estimativas precisas da função de sobrevivência. Pela comparação de seis modelos de distribuição (Menor valor extremo, Weibull, Normal, Log-normal, Logística, Log-logística) para a análise de sobrevivência na estimativa da probabilidade de rejeição de amostras com diferentes tempos de armazenamento, a distribuição Weibull ou Log-normal são as opções mais comumente adotadas na avaliação sensorial do prazo de validade (Hough, 2010b; Giménez *et al.*, 2012).

3.4.1.5 Metodologia Complementar - “Nariz Eletrónico”

A par da análise sensorial são adotados métodos complementares na determinação do prazo de validade, que permitem uma correlação da análise sensorial com parâmetros de ensaios instrumentais. O nariz humano tem a capacidade de detetar diferentes compostos voláteis, sendo de grande importância na avaliação da qualidade dos alimentos.

O odor ou aroma de um produto alimentar é percebido quando os seus produtos estão acima do limiar de deteção na fase de vapor e entram nas vias nasais (sensação ortonasal) ou entram pela boca e sistema respiratório (sensação retronasal),

respetivamente. Como tal, ao longo dos anos têm sido desenvolvidos diversos estudos direcionados à avaliação da qualidade dos géneros alimentícios com a aplicação de instrumentos operacionais tendo como princípio semelhante ao nariz humano. Este sistema não substitui, mas complementa as análises convencionais dos compostos voláteis por análise sensorial e análise instrumental clássica, nomeadamente as técnicas cromatográficas (Schaller *et al.*, 1998; Berna *et al.*, 2004). Ao contrário dos métodos de análise tradicionais de compostos voláteis por cromatografia gasosa, o Nariz Eletrónico não fornece informação sobre a natureza dos compostos em estudo, ou seja, não separa e identifica os componentes voláteis individuais (Benedetti *et al.*, 2005).

O sistema de Nariz Eletrónico é constituído por um conjunto de sensores químicos, que respondem a cada composto volátil de forma diferente, ligados a um computador ou sistema de processamento através de técnicas avançadas de conversão de sinal digital e reconhecimento de padrões estatísticos, como pode ser observado na Figura 3.2 (Berna *et al.*, 2004; Saevels *et al.*, 2004; Rodríguez-Gamboa *et al.*, 2011).

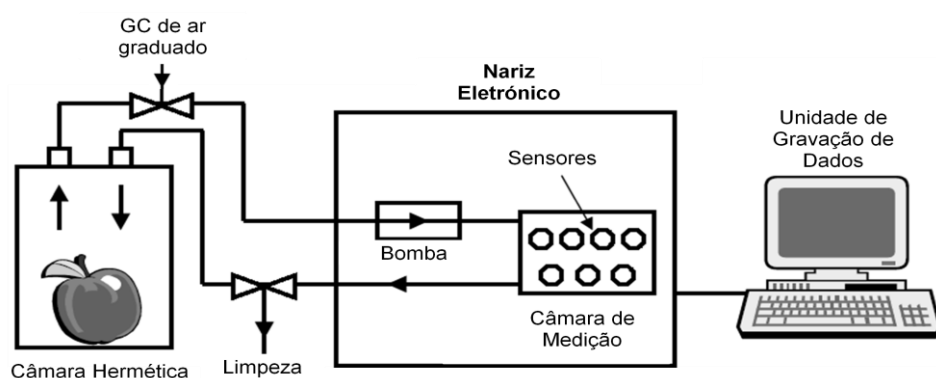


Figura 3.2 Diagrama esquemático relativo às medições de um sistema de Nariz Eletrónico baseado em sensores de microbalança de cristal de quartzo (adaptado de Saevels *et al.*, 2004)

Capítulo 4

Contextualização do Tema e Objetivos do Trabalho

A par das necessidades e exigências do consumidor, é imprescindível um controle contínuo da qualidade dos diferentes alimentos. Atualmente, e tendo em vista o contexto da sociedade em geral, a temática do prazo de validade após abertura da embalagem tem ganho cada vez mais reconhecimento. O produto enlatado, quando conservado em condições recomendadas, mantém-se com qualidade, mas após a sua abertura podem ocorrer alterações microbiológicas, físico-químicas e sensoriais, responsáveis pela sua deterioração.

O presente trabalho teve como principal objetivo definir o prazo de validade de conservas de atum e sardinha após abertura, quando armazenadas no frio (4°C) num recipiente de plástico próprio para acondicionamento de alimentos, dando resposta a uma solicitação de uma indústria conserveira. Para o efeito foram estudados parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e sensoriais ao longo de 7 dias de armazenamento. Com esta abordagem pretendeu-se definir o tempo de conservação em que é mantido o nível de qualidade do produto de forma global e simultaneamente, perceber qual, ou quais dos parâmetros estudados são determinantes na degradação do produto e na definição do limite de aceitabilidade para o consumidor.

Parte Experimental

Capítulo 5

Caracterização dos Produtos Avaliados

O estudo foi realizado em parceria com a empresa Ramirez & C^a(Filhos) S.A., que disponibilizou as amostras de conservas de atum e sardinha para o trabalho experimental.

De acordo com as informações disponibilizadas nas fichas técnicas de cada produto cedidas pela empresa (Ramirez, 2014) as características específicas a cada produto encontram-se resumidas na Tabela 5.1, bem como os códigos que os identificam ao longo do trabalho experimental. As fichas técnicas especificam ainda os ingredientes em detalhe, e também as características finais dos produtos, nomeadamente microbiológicas (produtos comercialmente estéreis) e algumas físico-químicas (produtos com textura, sabor, cheiro e aspeto típico; mercúrio e outros metais pesados de acordo com a legislação comunitária; e histamina inferior a 50ppm) (Ramirez, 2014).

5.1 Conservas de Atum

Obtidas a partir de lombos de atum da espécie *Katsuwonus pelamis* (“Skipjack”) (Figura 5.1), enlatados em recipientes metálicos de abertura fácil (alumínio ou folha-de-flandres com/sem litografia ou encartonado) hermeticamente fechados e adequadamente esterilizados por tratamento térmico, como descrito na ficha técnica do produto (Ramirez, 2014). Na Tabela 5.1 são descritos a composição relativa, o peso líquido/peso escorrido e o prazo de validade de cada uma das conservas de atum avaliadas, bem como os respetivos códigos de amostragem. Nesta classe estudou-se o atum “ao natural”, atum em óleo vegetal, atum com milho e feijão vermelho e atum com salada russa e maionese.

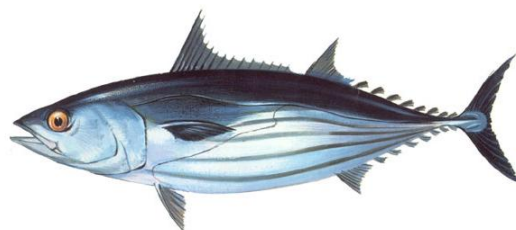


Figura 5.1 Atum: espécie *Katsuwonus pelamis* (“Skipjack”)

(<http://www.fao.org/fishery/species/2494/en>)

5.2 Conservas de Sardinha

Obtidas a partir da espécie *Sardina pilchardus* (Figura 5.2), sem cabeça, eviscerada, sem barbatana caudal, enlatada em recipientes metálicos de abertura fácil (alumínio ou folha-de-flandres com/sem litografia ou encartonado)

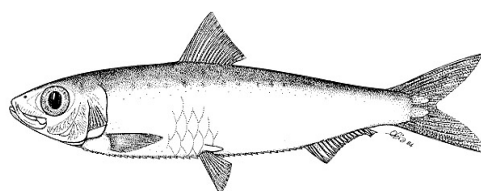









Figura 5.2 Sardinha: espécie *Sardina pilchardus*

(<http://www.fao.org/fishery/species/2910/en>)

hermeticamente fechados e adequadamente esterilizados mediante um tratamento térmico, tal como mencionado na ficha técnica do produto (Ramirez, 2014). Na Tabela 5.1 abaixo apresentada são descritos a composição relativa, o peso líquido/peso escorrido e o prazo de validade de cada uma das conservas de sardinha avaliadas, e os respetivos códigos de amostragem. Estudou-se a sardinha “ao natural”, em óleo vegetal e em molho de tomate.

Tabela 5.1 Composição, Peso Líquido/Peso Escorrido e Prazo de Validade das conservas de atum e sardinha avaliadas (Ramirez, 2014), e respetivos códigos de amostragem atribuídos

Conservas Avaliadas	Composição Relativa	Peso líquido/ Peso escorrido	Prazo Validade	Códigos Amostras
 “Atum ao Natural”	Atum: 70% Água: 29% Sal: 1%	120g/ 84g de atum (no mínimo)	3 anos	AN
 “Atum em Óleo Vegetal”	Atum: 65% Óleo Vegetal: 34% Sal: 1%	120g/ 78g de atum	5 anos	AO
 “Atum com Milho e Feijão Vermelho”	Atum: 35% Vegetais: variável Molho: variável	120g/ 42g de atum (no mínimo)	3 anos	AV
 “Atum com Salada Russa e Maionese”	Atum: 35% Maionese: 31% Vegetais: variável Sal: variável	120g/ 42g de atum (no mínimo)	4 anos	AM
 “Sardinha ao Natural”	Sardinha: 70% Água: 29% Sal: 1%	120g/ 84g de sardinha	3 anos	SA
 “Sardinha em Óleo Vegetal”	Sardinha: 70% Óleo Vegetal: 29% Sal: 1%	120g/ 84g de sardinha	5 anos	SO
 “Sardinha em Tomate”	Sardinha: 65% Tomate: 30% Óleo Vegetal: 4% Sal: 1%	120g/ 78g de sardinha	4 anos	ST

AN - Atum ao natural; **AO** - Atum em óleo vegetal; **AV** - Atum com milho e feijão vermelho; **AM** - Atum com maionese; **SN** - Sardinha ao natural; **SO** - Sardinha em óleo vegetal; **ST** - Sardinha em molho de tomate

Capítulo 6

Avaliação da Estabilidade das Amostras de Conservas após Abertura

Para a avaliação da qualidade das conservas previamente descritas, após abertura, foram realizadas análises **microbiológicas**, **sensoriais**, **físicas** e **químicas**. Seguidamente serão detalhados os procedimentos adotados na preparação das amostras, assim como descritos os parâmetros incluídos em cada tipo de análise.

6.1 Avaliação da Estabilidade Microbiológica

6.1.1 Amostragem

Para cada tipo de produto avaliado, a amostra utilizada foi constituída por quatro latas do mesmo lote (Landry, 2001). Este procedimento foi adotado para aumentar a representatividade do lote uma vez que, se presentes, os microrganismos podem não estar homogeneamente distribuídos pelas diferentes latas.

Cada lata foi desinfetada antes da abertura com uma solução contendo 4% de iodo e 70% de etanol segundo recomendações publicadas (Landry, 2001), abertas e manipuladas em condições de assepsia (na proximidade de um bico de Bunsen e usando material estéril), de modo a impedir a contaminação da amostra com microrganismos contaminantes externos durante a manipulação. O conteúdo das quatro latas foi misturado, manualmente, num saco estéril constituindo a amostra base de análise. Para avaliação da estabilidade em diferentes tempos de refrigeração, uma porção da amostra de cerca de 10g foi distribuída por quatro sacos estéreis (10g/saco), para análise em dias distintos: **Dia 0** - 0 horas; **Dia 1** - 24 horas; **Dia 2** - 48 horas; **Dia 7** - 168 horas). No dia 0, as amostras foram analisadas imediatamente após a sua abertura e mistura. As amostras dos dias 1, 2 e 7 foram mantidas nos sacos estéreis devidamente fechados e armazenadas a temperaturas de refrigeração (4°C) até à sua utilização.

A figura 6.1 resume, de forma esquemática, a amostragem global do estudo, incluindo as análises microbiológicas, bem como para as análises sensoriais e físico-químicas que serão detalhadas posteriormente em 6.2.

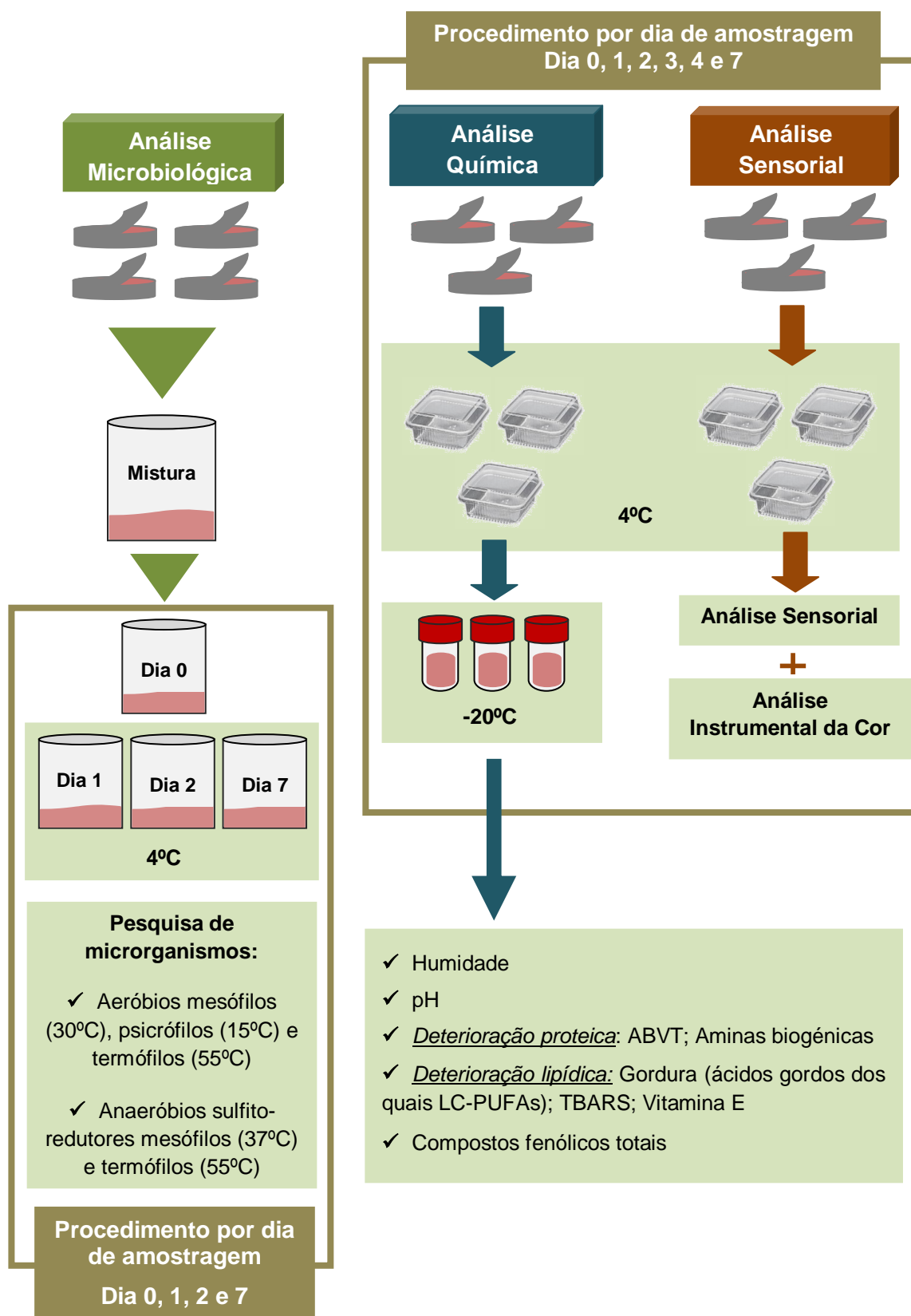


Figura 6.1 Esquema que sintetiza todos os parâmetros microbiológicos, sensoriais, físicos e químicos avaliados no âmbito do presente trabalho

6.1.2 Parâmetros Microbiológicos Avaliados

Tal como mencionado em capítulos anteriores, as conservas sofrem um tratamento térmico que deverá destruir os microrganismos presentes. No entanto, após abertura e acondicionamento a temperaturas de refrigeração, as conservas passam a ser classificadas como produtos prontos a comer e podem ser incluídas em duas categorias: **Dia 0** - *“Alimentos estáveis à temperatura ambiente imediatamente após a abertura”*; **Dias 1 ao 7** - *“Alimentos cozinhados e refrigerados com alguma manipulação”* (HPA, 2009). Assim, a gama de temperaturas, tipos de atmosferas e práticas de manipulação a que o produto está sujeito desde a sua produção até à sua abertura e, principalmente, o ambiente onde é feita esta abertura e posterior refrigeração, poderá influenciar a sua qualidade e permitir o crescimento de microrganismos com diversas características. Tendo estes dados em consideração, para avaliar a estabilidade microbiológica das conservas após abertura e refrigeradas em tempos distintos realizou-se o parâmetro de qualidade “contagem de microrganismos totais viáveis”, usualmente aplicado a estudos de prazo de validade, a diferentes temperaturas e atmosferas. Contaram-se assim os grupos **aeróbios mesófilos**, **psicrófilos** e **termófilos**, assim como **anaeróbios sulfito-redutores mesófilos** e **sulfito-redutores termófilos** (Tabela 6.1).

Embora a probabilidade dos vários grupos de microrganismos estarem presentes no dia 0 e 7 não seja igual para todos eles, os parâmetros escolhidos foram analisados em todos os tempos para possível comparação. Mais concretamente, a pesquisa de aeróbios mesófilos é um parâmetro microbiológico recomendado para a avaliação da qualidade dos produtos alimentares em geral, daí ser aplicado neste estudo. O estudo da presença de microrganismos aeróbios psicrófilos faz também sentido, principalmente nos dias subsequentes à abertura, uma vez que as amostras foram armazenadas no frigorífico, sendo considerado como um alimento cozinhado e refrigerado com alguma manipulação. Esta probabilidade de crescimento nos dias em que as amostras se encontram sob temperaturas de refrigeração já não se verifica para os aeróbios termófilos e anaeróbios sulfito-redutores mesófilos e termófilos. De facto, a sua pesquisa é também correlacionada com a qualidade deste tipo de produto, pois estes podem estar presentes na conserva como resultado de uma resistência às condições de esterilização e do ambiente de anaerobiose criado no interior da lata, daí que seja mais provável o seu aparecimento no dia da sua abertura. Contudo, o seu controlo já faz parte dos procedimentos normativos das empresas de produção de produtos enlatados.

Para cada dia de amostragem, com exceção do dia 0, foi retirada uma embalagem do frigorífico, e as 10g de amostra foram suspensas e homogeneizadas, durante 2 minutos com o auxílio do Stomacher, em 100mL de solução diluente constituída por

peptona bacteriológica (0,1%; Frilabo, PT) e cloreto de sódio (0,85%, VWR, Alemanha) em água destilada (primeira diluição - 10^{-1}). Nas amostras contendo um teor de gordura mais elevado foi adicionado também Tween 80 (0,5%, Sigma-Aldrich) (ISO 6887-5:2000). Da mistura, já homogeneizada, foi feita uma segunda diluição decimal, 10^{-2} , na mesma solução diluente. Este número de diluições (10^{-1} e 10^{-2}) baseou-se em ensaios preliminares (dados não apresentados). Para cada parâmetro pesquisado, cada diluição foi analisada em duplicado.

A Tabela 6.1 resume as diversas condições (meios de cultura, volumes de amostra usados por análise, temperaturas e tempos de incubação) usadas na análise dos diferentes parâmetros pesquisados, tal como especificadas em diversas normas ISO e/ou no Codex Alimentarius. Os meios de cultura foram adquiridos à Frilabo (PT), as placas de Petri estéreis provenientes da Normax (PT) e utilizadas diferentes estufas para a incubação das placas. A estimativa do número de unidades formadoras de colónias por grama de alimento (UFC/g) foi determinada segundo as especificações da ISO 7218:2007.

Tabela 6.1 Parâmetros microbiológicos pesquisados e condições experimentais utilizadas

Microrganismos Avaliados	Condições de Plaqueamento	Condições de Incubação	Referências
Aeróbios Mesófilos	1000µL por incorporação em Plate Count Agar	30°C, 5 dias	Codex Alimentarius, 1979; ISO 4833:2003
Anaeróbios Sulfito-redutores Mesófilos	1000µL por incorporação/mistura em Iron Sulfite Agar	37°C, 10 dias	Codex Alimentarius, 1979; ISO 15213:2003
Aeróbios Psicrófilos	100µL por espalhamento à superfície em Plate Count Agar	15°C, 10 dias	ISO 4833-2:2013; Oranusi <i>et al.</i> , 2012
Aeróbios Termófilos	100µL por espalhamento à superfície em Plate Count Agar	55°C, 10 dias	Codex Alimentarius, 1979
Anaeróbios Sulfito-redutores Termófilos	1000µL por incorporação/mistura em Iron Sulfite Agar	55°C, 10 dias	Codex Alimentarius, 1979; ISO 15213:2003

6.2 Avaliação da Estabilidade Física, Química e Sensorial

A metodologia adotada na amostragem para análise das componentes físico-químicas foi a mesma para a vertente sensorial, que a seguir se descreve. Esta amostragem pretendeu mimetizar o procedimento realizado pelo consumidor que

pretende guardar sob refrigeração parte do conteúdo da lata não consumido no momento de abertura.

6.2.1 Amostragem

Os passos envoltos à amostragem foram realizados no Laboratório de Controlo da Qualidade da empresa Ramirez & C^a (Filhos) S.A. Para cada tipo de produto avaliado, e para cada tempo de refrigeração estudado, a amostra utilizada para análise era constituída por três latas, sendo todas do mesmo lote. Cada lata foi aberta e o seu conteúdo transposto, por inversão, individualmente, para um recipiente de plástico (próprio para acondicionamento de alimentos) (Figura 6.2). Posteriormente, com exceção das amostras avaliadas no momento da abertura (**Dia 0** - 0 horas), as amostras foram conservadas no frigorífico (4°C) para serem analisadas em mais cinco momentos distintos: **Dia 1** - 24 horas; **Dia 2** - 48 horas; **Dia 3** - 72 horas; **Dia 4** - 96 horas; e **Dia 7** - 168 horas. Assim, para cada dia de amostragem, as análises foram sempre feitas em 3 latas distintas, num total de 18 latas (3 x 6 dias de análise) para a análise sensorial e um número igual para a análise físico-química.

Em cada dia de análise, as amostras respetivas foram retiradas do frigorífico e, após cerca de 15 minutos de repouso à temperatura ambiente, foi feita a análise sensorial pelo painel de provadores. Nestas mesmas amostras foi feita posteriormente a avaliação da cor instrumental, conforme será detalhado posteriormente. Por questões logísticas, e uma vez que a empresa estava preparada para fazer a avaliação do pH no próprio laboratório, as amostras da análise sensorial foram trituradas e avaliou-se o pH, conforme será detalhado posteriormente, sendo posteriormente rejeitadas.

Para a análise química foram igualmente retiradas do frigorífico as amostras por dia de amostragem, sendo neste caso o molho escorrido de acordo com os padrões usuais de utilização pelo consumidor. Este molho foi ainda assim conservado em frascos individuais para o caso de se vir a revelar interessante proceder a alguma análise no mesmo. No caso das amostras de atum com vegetais e atum com maionese não foi possível separar o molho das mesmas, depreendendo-se que também não seria uma prática feita pelo consumidor, pelo que a amostra foi analisada como um todo. As amostras foram moídas com o auxílio de uma trituradora (Figura 6.3), e transferidas, individualmente, para frascos de plástico, e congeladas até posterior análise química. Assim, para cada dia e produto existiam três frascos congelados, sendo as análises químicas realizadas em cada um dos 3 frascos.



Figura 6.2 Recipiente de plástico contendo a amostra para análise sensorial, física e química



Figura 6.3 Exemplo de uma amostra moída com o auxílio de uma trituradora para posterior análise química

6.2.2 Parâmetros Sensoriais Avaliados

A análise sensorial foi realizada na empresa Ramirez & C^a(Filhos) S.A., que disponibilizou um grupo de 7 provadores treinados neste mesmo tipo de amostras. Contudo, e de modo adaptar o painel de provadores aos atributos que se pretendia avaliar neste tipo de ensaio, e que divergia um pouco do usual no controlo de qualidade da empresa, não só pelo acréscimo de atributos, mas também pela complexidade no detalhe dos mesmos, foi feito um treino prévio com amostras em tudo idênticas, para reconhecimento e familiarização com os diferentes atributos a avaliar e eventual ajuste dos mesmos na ficha de análise sensorial.

Na análise sensorial propriamente dita, as amostras foram apresentadas de forma codificada, diretamente nas embalagem de plástico retiradas do frigorífico. Para evitar enviesamento na classificação das amostras pelo intuitivo aumento do tempo de conservação das amostras após abertura, as amostras foram apresentadas em 2 sequências, incluindo na primeira a amostra controlo (dia 0) e a amostra do dia 1 e 2, e no dia seguinte de análise sensorial eram apresentadas as amostras dos dias 3, 4 e 7, sempre codificadas e sem conhecimento algum por parte dos provadores. Para isso, as amostras foram colocadas no frigorífico em dias anteriores de modo a que no momento da análise sensorial fosse possível colocar em paralelo diferentes dias de armazenamento.

Os atributos definidos variaram consoante a amostra em análise, dadas as suas características inerentes. Incluíam características relativas à cor, aspeto, cheiro e sabor, quer para o peixe (atum ou sardinha) quer para o molho (salmoura, óleo, tomatada e maionese) e vegetais. Assim, a Tabela 6.2 resume os atributos que constavam das fichas fornecidas aos provadores para cada tipo de produto. Todos os parâmetros foram avaliados tendo por base uma ficha de análise sensorial de escala estruturada, de 0 a 5

(0 - sem alteração e 5 - deterioração máxima). Os resultados são apresentados na forma de média e desvio padrão dos resultados dos 7 provadores. Contudo, dada a abundância de atributos avaliados, apenas serão discutidos os parâmetros em que foram verificadas alterações com o tempo de refrigeração. Assim, todos os atributos não apresentados na parte da discussão dos resultados deverão ser interpretados como não sendo afetados pelo armazenamento nas condições do ensaio.

Tabela 6.2 Atributos sensoriais avaliados nas diferentes amostras de conservas

Parâmetros	Atributos
Todo conteúdo da lata	<i>Cheiro</i>
	Oxidação
	Fermentação
	Pútrido
	<i>Sabor</i>
	Salgado
	Ácido
	Pútrido
Molho (se aplicável)	<i>Cor</i>
	Descoloração
	Escurecimento
	Turvação
Peixe	<i>Aspetto</i>
	Espesso
	Líquido
	Coágulos gelatinosos
	<i>Cor (interior e exterior)</i>
	Descoloração
	Escurecimento
	Cor estranha
	<i>Aspetto</i>
	Alteração da homogeneidade
	Seco/Fibroso
	Húmido
	Perda de brilho/Baço
	<i>Textura (na boca)</i>
	Seca/Fibrosa
	Mole
Vegetais (se aplicável)	<i>Cor</i>
	Pegajosa
	Descoloração
	Escurecimento
	Cor estranha
	<i>Textura</i>
	Seca/Fibrosa
	Mole
	Pegajosa

6.2.3 Parâmetros Físicos Avaliados

6.2.2.1 Cor

A cor foi avaliada com um colorímetro (Minolta Chroma Meter CR300, Japão), utilizando o sistema de cor **CIE L*a*b***, em que **L*** representa a luminosidade ($0 < L^* < 100$), **a*** a variação de vermelho (+) a verde (-) e **b*** a variação entre amarelo (+) e azul (-). Foi também determinada a variação total da cor (**ΔE**) de acordo com Pathare *et al.* (2013). O equipamento foi calibrado com uma placa de cor branca, segundo as instruções do fabricante. Consoante o tipo de amostra (conservas de atum ou sardinha) as medições foram realizadas sempre nas mesmas condições, tendo o cuidado de fazer as determinações num local com o mínimo de interferências de cor e luz exterior ao sistema:

- ♦ **Sardinha:** 3 medições no exterior + 3 medições no interior em cada sardinha (cada lata apresentava sempre 3 sardinhas), sempre no sentido da “cabeça” para a “cauda”, num total de 9 mediações em cada parâmetro e por lata (9 x 3 por dia);
- ♦ **Atum:** 3 medições no exterior + 3 medições no interior (após mistura com o garfo) em cada parâmetro e por lata (3 x 3 por dia); nas amostras de atum com vegetais, também foram feitas medições nos vegetais separados manualmente (1 medição por tipo de vegetal);
- ♦ **Molho:** 1 medição por lata (molho contido nos frascos de análise).

6.2.3 Parâmetros Químicos Avaliados

No momento da análise química, as amostras foram previamente descongeladas no frigorífico (4°C), com exceção do pH que, que foi determinado logo após moagem da amostra utilizada na análise sensorial. Para cada parâmetro e para cada dia de amostragem foram avaliadas 3 latas (n=3).

6.2.3.1 Potencial Hidrogeniónico (pH)

O potencial hidrogeniónico foi medido, à temperatura ambiente, com um elétrodo de pH próprio para amostras sólidas (Medidor de pH GLP 21, Crison, Espanha). O elétrodo era calibrado diariamente, apresentava uma sensibilidade de 0,01 e, para as amostras em análise, apresentou uma repetibilidade <0,5%.

6.2.3.2 Teor de Humidade

O teor de humidade foi avaliado numa balança de humidade com aquecimento por infravermelho (Scaltec SMO 01, Alemanha) a 105°C, utilizando aproximadamente 3-4g de cada amostra, até atingir peso constante. Os resultados foram expressos em % de

humidade, equivalente à perda de massa durante o processo de secagem. O equipamento tem uma sensibilidade de 0,05% e, para as amostras em análise, apresentou uma repetibilidade <0,5%.

6.2.3.3 Azoto Básico Volátil Total (ABVT)

A determinação do ABVT teve por base o método de referência descrito no Regulamento (CE) N°2074/2005 da Comissão de 5 de Dezembro de 2005, que descreve o procedimento para a determinação da concentração de ABVT (teor de azoto sob a forma de bases azotadas voláteis) em peixe e produtos de pesca. Este método é aplicável a concentrações de ABVT compreendidas entre 5mg N/100g e, pelo menos, 100mg N/100g.

Foram homogeneizadas 5,0g de amostra com 90mL de solução de ácido perclórico 6% (m/v; Merck, Alemanha), com o auxílio do Ultra Turrax T25 Basic (Janke & Kunkel IKA®, Alemanha), seguido de filtração em papel de filtro. Do extrato obtido eram transferidos 40 mL para tubo de destilação (BUCHI, Suíça), adicionada algumas gotas de solução de fenolftaleína e de agente antiespuma (Aldrich, USA). Num matrâz para receção do destilado foram colocados 100 ml de solução de ácido bórico 3% (m/v, Scharlab S. L., Espanha) e 5 gotas de solução indicadora (indicador misto de Tashiro). O extrato foi então submetido à destilação por arrastamento de vapor, após adição 5mL de NaOH 30% (m/v, VWR, Alemanha), num sistema BUCHI 321 Destillation Unit (BUCH AG, Suíça), durante 5 minutos, sendo os componentes de base volátil absorvidos pelo ácido recetor. Após destilação, o teor de bases voláteis presentes na solução recetora foi determinado por titulação com solução padrão de HCl 0,01M (Merck, Alemanha). Os resultados foram expressos em mg de N/100g de amostra. A sensibilidade do método era de 0,6mg N/100g e, nas condições do ensaio utilizadas, apresentou uma repetibilidade <1%.

6.2.3.4 Aminas Biogénicas

A determinação das aminas biogénicas teve como base de trabalho estudos publicados por Hornero-Méndez e Garrido-Fernández (1994), Casal *et al.* (2002) e Hu *et al.* (2012). Resumidamente, as aminas foram extraídas com uma solução de ácido tricloroacético, na presença de padrão interno, seguidas de limpeza do extrato por um agente de par-iónico, derivatização com cloreto de dansilo e análise por HPLC.

Extração

Foram pesadas, rigorosamente, cerca de 5,0g de amostra para tubo tipo Falcon, às quais foi adicionado 150µg de padrão interno (1,7 diaminoheptano; Aldrich, USA), a partir de uma solução-mãe preparada a 2,5mg/mL em HCl 0,1M (Merck, Alemanha), seguidos de 25,0mL de solução de ácido tricloroacético a 5% (m/v, Merck, Alemanha). A mistura foi homogeneizada com o auxílio do Ultra Turrax durante 2 minutos (colocando o recipiente em gelo para reduzir o aumento de temperatura na solução). O homogeneizado foi então centrifugado a 5000rpm por 10 minutos (Labofuge Ae, Heraeus Sepatech, Alemanha), seguido por uma filtração de parte do sobrenadante por papel de filtro. Posteriormente, 2,0mL da solução filtrada foram submetidos a um procedimento de limpeza por par iônico com BEHPA (hidrogenofosfato de bis(2-etil-hexilo); 97%, Aldrich, USA). Para o efeito, o pH do extrato foi ajustado a 7,4 e adicionado de 3,0mL de tampão de fosfato pH 7,4 (0,1 M). A solução tamponada foi extraída com 2,0mL de solução BEHPA (0,1M em clorofórmio, VWR, Alemanha), por agitação em vórtex durante 2 minutos, seguida de uma centrifugação a 5000rpm por 5 minutos. A fase inferior (fase clorofórmica) foi pipetada no seu total para um novo tubo, à qual foram adicionados 2,0mL de solução HCl (Merck, Alemanha) e submetidos novamente a agitação no vórtex e centrifugação como referido anteriormente. A fase aquosa superior contém as aminas biogénicas extraídas.

Derivatização

Após a fase de extração, procedeu-se para a fase de derivatização para ser possível a sua deteção e quantificação por HPLC com deteção por fluorescência. Assim, da fase superior resultante da última fase de limpeza de par iônico com BEHPA foram retirados 500µL para um novo tubo e adicionado 1,0mL de solução saturada de carbonato de sódio (Sigma, USA) com ajuste do pH a 11.0 - 11.2. Seguidamente, foi adicionado 1,0mL de agente derivatizante (cloreto de dansilo - Sigma, USA, a partir de solução preparada a 10mg/mL em acetona), agitou-se ligeiramente no vórtex, colocando posteriormente num banho de água controlado termostaticamente a 60°C, durante 30 minutos. Passado este tempo foram adicionados 100µL de solução de prolina (L-prolina - Fluka, USA, a partir de solução preparada a 100mg/mL em água), para reação com o excesso de cloreto de dansilo e estabilização dos derivados. A solução foi homogeneizada no vórtex e deixada a repousar no escuro durante 15 minutos à temperatura ambiente. A extração das aminas biogénicas derivatizadas foi realizada com 1,5mL de tolueno (Merck, Alemanha), seguida de agitação durante 30 segundos e congelação a -20°C durante 15 minutos. A fase orgânica superior era separadamente rapidamente e levada à secura sob corrente de azoto a 60°C (Pierce Reacti-Therm

Heating Module Series with Reacti-Vap Evaporating unit, USA). O sedimento foi ressuspenso em 300µL de acetonitrilo (VWR, Alemanha), centrifugado a 13000rpm (Heraeus Biofuge Pico, Alemanha) e transferidos para frascos apropriados para injeção no amostrador automático.

Condições cromatográficas

A separação das aminas derivatizadas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) num equipamento da marca Jasco (Japão), constituído por duas bombas de alta pressão (PU-980), um módulo de mistura, injetor automático (AS-950) e um detetor de díodos (MD-910) ligado em série com um detetor de fluorescência (FP-920), programado para excitação a 252 nm e emissão a 500 nm.

A separação foi realizada numa coluna de fase reversa Gemini NX (150 x 4,6 mm; 5µm, Phenomenex, USA), à temperatura ambiente de 25°C. A eluição foi realizada a 1mL/minuto com um gradiente linear de um eluente A (solução de ácido fosfórico 0,05M, Merck, Alemanha) e um eluente B (solução de metanol/acetonitrilo, 1:1), com um programa de gradiente: 0 minutos - 40% A e 60% B; 15 minutos - 20% A e 80% B; 20 minutos - 20% A e 80% B; 22 minutos - 7,5% A e 92,5% B; 25 minutos - 5% A e 95% B; 30 minutos - 5% A e 95% B. A água para HPLC foi obtida num sistema de desionização (Seralpur Pro CN90, Alemanha), com filtro incorporado de 0,22 µm. A análise dos dados cromatográficos foi feita com recurso ao software Borwin-PDA Controller Software (JMBS, França).

Quantificação

O teor de aminas presentes nas amostras foi quantificado através de curvas de calibração com padrões comerciais, mais concretamente: dihidroclorato de putrescina, dihidroclorato de cadaverina, dihidroclorato de histamina, hidrocloreto de tiramina, trihidroclorato de espermidina e tetrahidroclorato de espermina, todos da Sigma (USA). Foram preparadas soluções-mãe individuais a 10mg/mL em água, mantidas sob refrigeração, e preparadas diluições com as 6 aminas a 2mg/mL de base ativa em solução aquosa de HCl 0,1M (Merck, Alemanha). A partir desta mistura foram preparadas diluições para construção das respetivas curvas de calibração. Estas diluições foram adicionadas de padrão interno, diluídas em ácido tricloroacético a 5% (m/v, Merck, Alemanha) e sujeitas a todo o processo extrativo conforme as amostras. Desta forma, os resultados foram expressos diretamente em mg/kg de amostra. A metodologia apresentou um limite de quantificação de 0,2mg/kg, uma gama de linearidade de 0,2 a 20mg/kg e uma repetibilidade <5%.

Adicionalmente utilizou-se também o Índice de aminas biogénicas, conforme referido por Prester (2011), correspondente à soma da putrescina, cadaverina, tiramina e histamina.

A figura 6.4 representa, a título de exemplo, um cromatograma obtido para uma amostra de sardinha em molho de tomate.

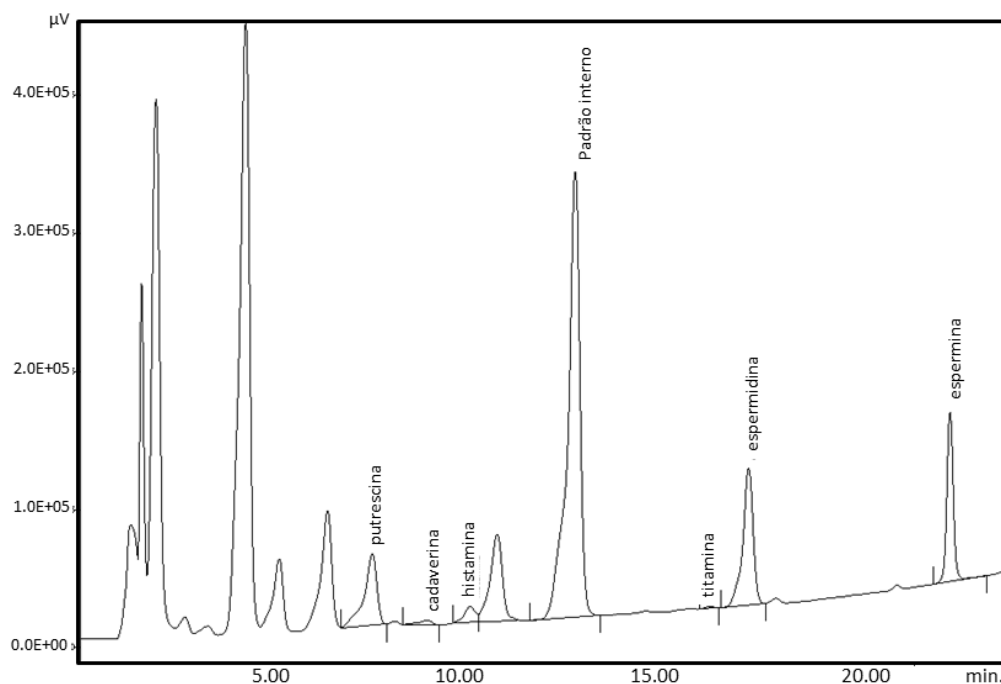


Figura 6.4 Exemplo de uma cromatograma obtido com uma amostra de sardinha em molho de tomate para quantificação das aminas biogénicas por HPLC e deteção por fluorescência

6.2.3.5 Ácidos Gordos e Vitamina E

A determinação do teor de ácidos gordos e vitamina E teve como referência o método descrito por Cruz *et al.* (2013). O processo de extração foi comum para os ácidos gordos e vitamina E. Já no que respeita ao processo de quantificação a metodologia adotada foi diferente, conforme será detalhado.

Extração

Consoante o teor lipídico esperado na amostra, foram pesadas rigorosamente entre 1,0g e 0,5g de amostra para tubos apropriados. Em seguida, colocou-se 2 esferas de vidro, 0,5mg de BHT (Sigma, USA, a partir de solução a 10mg/mL preparada em metanol), 0,3mg de triundecanina como padrão interno para os ácidos gordos (Sigma, USA; a partir de solução preparada a 15mg/mL em hexano) e 20µg de tocol como padrão interno para a quantificação da vitamina E livre (Matreya, USA, a partir de uma solução a 1 mg/mL em hexano). Após adição de 2-propanol (1575µL, Roth, Alemanha) o conteúdo foi fortemente misturado no vórtex durante 2 minutos, seguido da adição de ciclohexano

(2040 μ L, Roth, Alemanha), novamente sujeito a agitação por 2 minutos no vórtex e deixado em repouso durante a noite no frigorífico. Após este período, os frascos foram agitados para total dispersão do conteúdo entretanto parcialmente depositado e adicionou-se solução aquosa de NaCl a 0,9% (2280 μ L, VWR, Bélgica) seguida de nova agitação em vortex por 2 minutos. A separação da mistura ternária de solventes ocorreu após centrifugação a 5000rpm durante 5 minutos. A fase superior (ciclohexano) foi retirada para frascos de vidro. Ao remanescente foi adicionada mais uma porção idêntica de ciclohexano, de novo misturada no vórtex por 2 minutos e centrifugada nas mesmas condições. O sobrenadante foi recolhido e adicionado aos tubos de vidro que já continham o primeiro sobrenadante. De seguida, a solução foi levada à secura em corrente de azoto a 60°C. A fração lipídica obtida foi ressuspensa num volume que variou entre 500 e 1000 μ L de n-hexano (Merck, Alemanha), consoante a fração lipídica obtida, e utilizada para quantificação da quantidade de ácidos gordos e de vitamina E.

Quantificação dos Ácidos Gordos

Foram pipetados 400 μ L da solução resultante da extração descrita anteriormente para tubos de pirex rolhados, próprios para suportar altas temperaturas. O hexano foi evaporado sob corrente de azoto a 60°C, seguidos da adição de 1,5mL de solução de KOH 0,5M preparada em metanol e colocados numa estufa a 100°C durante 10 minutos (WTC Binden, Alemanha). Após terem sido retirados e arrefecidos, foram adicionados 1,5mL de trifluoreto de boro a 14% em metanol (BF₃, Sigma, USA) e colocados novamente na estufa a 100°C durante 30 minutos. Em seguida, e após arrefecimento, foram adicionados 2,5mL de NaCl a 0,9% e 2,0 mL de n-hexano e misturados no vórtex. Esta mistura foi depois sujeita a uma centrifugação a 5000rpm durante 5 minutos. Retirou-se uma porção do hexano sobrenadante, que contem os ésteres metílicos dos ácidos gordos e reduziu-se uma eventual presença de humidade pela adição de sulfato de sódio anidro (VWR, Alemanha). Após centrifugação a 13000rpm o sobrenadante foi transferido para tubos de injeção.

Condições cromatográficas: a determinação do perfil de ácidos gordos foi realizada por cromatografia gasosa (GC) utilizando um sistema Chrompack (CP-9001, Holanda) com deteção por ionização em chama (FID). A temperatura do injetor e detetor foram de 250°C e 270°C, respetivamente. A coluna utilizada, uma Select FAME (50m; 0.25mm ID; da Agilent, USA), com hélio foi utilizado como o gás de arraste a uma pressão interna de 120 kPa, foi acondicionada a 120°C, sendo a separação feita com aumento gradual da temperatura até aos 205°C a uma taxa de 2°C/minuto. O volume de injeção foi de 0,8 μ L numa razão de partição de 1:20. A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos

e calibração do detetor FID foi feita com recurso a uma mistura de padrões calibrada Supelco 37-FAME Mix (Supelco, USA) e alguns padrões individuais de fornecedores diversos. Os resultados são expressos em massa de ácidos gordos por 100g de amostra, tendo por base a estimativa dos ácidos gordos totais obtidos a partir da resposta do padrão interno, a triundecanoína.

Para efeito do presente estudo, o total de ácidos gordos será referido como gordura total, cientes de que se apresenta sistematicamente por defeito, dada a existência de outros componentes lipofílicos nas amostras. Previamente foi feita uma comparação entre a extração clássica a quente em dispositivo de Soxhlet com éter de petróleo (dados não apresentados). Apesar do teor gravimétrico de gordura total se apresentar superior na extração a quente, ocorria redução no teor de vitamina E e na percentagem relativa de EPA e DHA, indicativos de oxidação. Dado que no presente estudo se pretendia avaliar a variação dos parâmetros ao longo do tempo de armazenamento e não os valores absolutos de cada componente, optou-se pela extração a frio. Nas condições de extração definidas, a metodologia apresentou um limite de quantificação de 0,1 mg/kg e uma repetibilidade <5% para teores de gordura inferiores a 4% e 2% para amostras com mais que 4% de ácidos gordos. A repetibilidade na percentagem relativa dos LC-PUFAs era <2% no atum e <1% na sardinha.

A figura 6.5 representa, a título de exemplo, um cromatograma de uma amostra de sardinha ao natural, salientando-se os principais ácidos gordos quantificados.

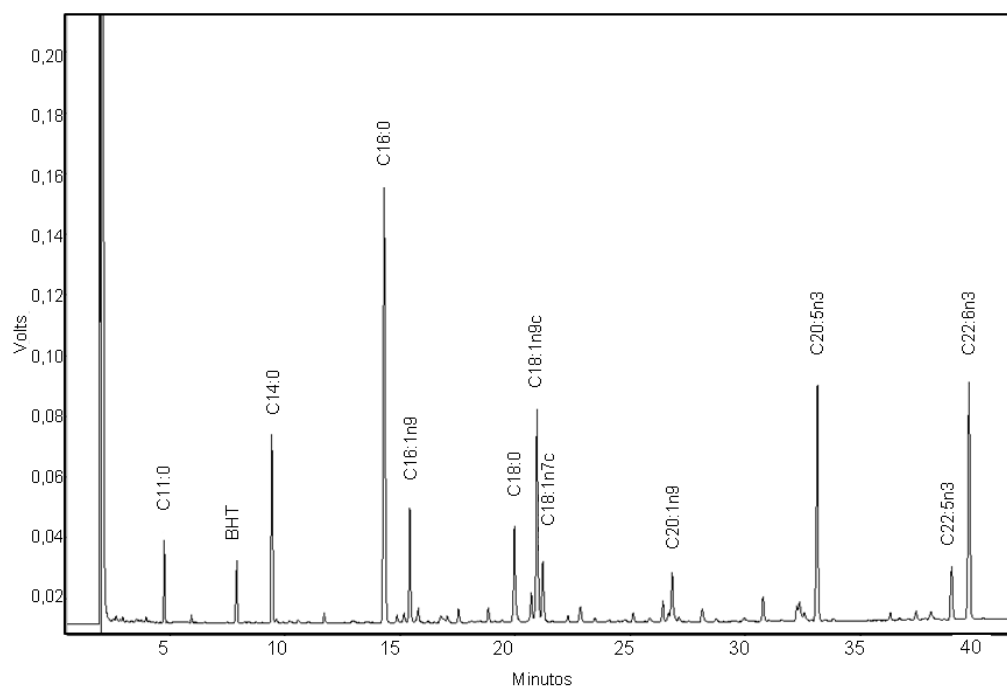


Figura 6.5 Exemplo de uma cromatograma obtido com uma amostra de sardinha ao natural para quantificação dos ácidos gordos por GC com deteção por ionização em chama (FID)

Quantificação da Vitamina E

Uma segunda porção da solução centrifugada resultante da extração comum a ambos os componentes foi colocada em frascos próprios para a injeção no amostrador automático do sistema de HPLC utilizado.

Condições cromatográficas: a quantificação dos níveis de vitamina E foi realizada por HPLC, utilizando o mesmo sistema cromatográfico referido para a quantificação das aminas biogénicas. Contudo, neste caso trabalhou-se em fase normal, utilizando uma coluna de sílica (Supelcosil™ LCSI column; 75×3.0 mm, 3 µm; Supelco, USA) e como eluente uma mistura isocrática de n-hexano e 1,4-dioxano (97,5:2,5%, v/v, VWR, Alemanha) com um fluxo de 0,8mL/minuto, à temperatura ambiente. Para a detecção aproveitou-se a fluorescência natural destes compostos, com programação para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. Os compostos foram identificados por recurso a padrões adquiridos a diversos fornecedores, recorrendo à co-eluição e confirmação pelos espectros obtidos no detetor de díodos acoplado em série. Para cada composto identificado foram feitas curvas de calibração numa gama de concentrações entre 2 e 35µg/mL para o α -tocoferol e δ -tocoferol, e entre 5 e 71µg/mL para γ -tocoferol. Às soluções de padrões foi adicionado padrão interno e as misturas foram sujeitas ao processo extrativo descrito acima para extração dos lípidos, sendo por isso os resultados diretamente expressos em mg/100g de amostra. O limite de quantificação do método foi de 10µg/100g de amostra, com uma repetibilidade <2%. A figura 6.6 representa um cromatograma obtido com uma amostra de sardinha em óleo vegetal.

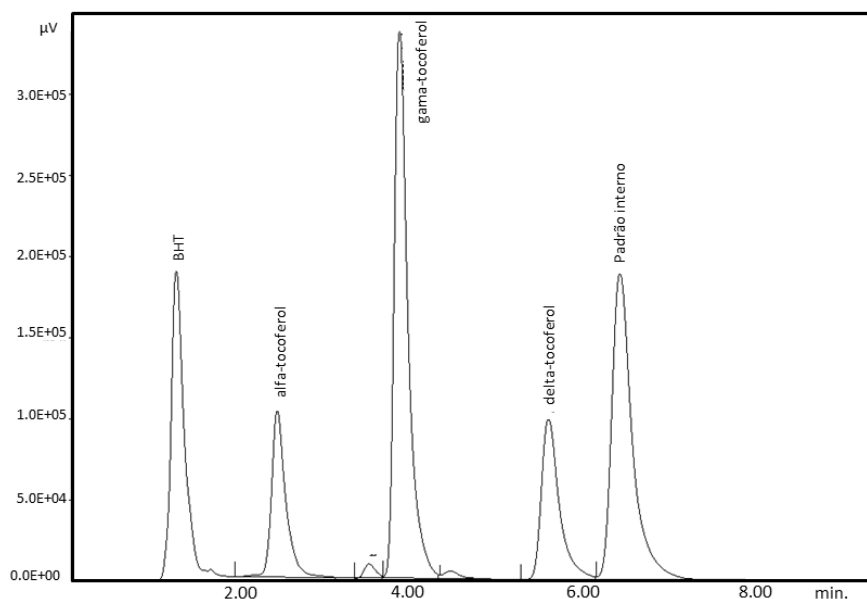


Figura 6.6 Exemplo de uma cromatograma obtido com uma amostra de sardinha em óleo vegetal para quantificação da vitamina E por HPLC e detecção por fluorescência

6.2.3.6 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O procedimento experimental adotado para a quantificação de TBARS baseou-se no método descrito por Papastergiadis *et al.* (2012), apesar de terem sido feitas ligeiras alterações no que respeita aos volumes utilizados na reação de quantificação. A amostra (2,0g) foi homogeneizada com 15,0 mL de ácido tricloroacético 7,5% (m/v, Merck, Alemanha), no mesmo Ultra Turrax descrito anteriormente. O homogeneizado foi centrifugado (5000rpm durante 5 minutos) e foram recolhidos 500µL do sobrenadante, aos quais se adicionou 500µL de solução de ácido 2-tiobarbitúrico 46mM (Panreac, Espanha) preparada em ácido acético glacial 99% (VWR, Alemanha). Os tubos foram colocados num banho de água a 95°C durante 35 minutos e posteriormente arrefecidos à temperatura ambiente. A leitura da absorvência foi feita a 532nm num espectrofotómetro de placas (Spectrostar nano, BMG LabTech, Alemanha).

Para quantificar o teor de TBARS presente nas amostras foi efetuada uma curva de calibração com soluções padrão de malondialdeído (MDA) preparadas a partir de 1,1,3,3-tetraetoxipropano - TEP (>95%, Merck, Alemanha), com concentrações entre 0,5 e 15µM. A determinação da concentração de TBARS nas amostras foi obtida por interpolação na curva de calibração obtida. Os resultados foram expressos em mg MDA/kg de amostra. O limite de quantificação do método foi de 0,3mg MDA/kg, com uma linearidade até 6 mg/kg. A repetibilidade nas condições de ensaio foi <5%.

6.2.3.7 Compostos Fenólicos Totais

Para a determinação deste parâmetro químico, recorreu-se a duas metodologias distintas, a primeira segundo Pérez-Jiménez *et al.* (2008) para a extração dos compostos fenólicos e a segunda de acordo com Chaovanalikit e Wrolstad (2004) para a quantificação dos compostos fenólicos totais presentes nas amostras avaliadas. A uma porção de 0,5g de amostra foram adicionados 20mL de uma solução de metanol/água (50:50, v/v, pH=2 com HCl 0,1M, Merck, Alemanha), seguida de agitação cuidadosa durante uma hora num agitador orbital (Edmund Bühler modelo KL2, Alemanha). A mistura foi centrifugada (5000rpm durante 10 minutos) e o sobrenadante recolhido para segundo tubo. Numa segunda fase de extração foram adicionados 20mL de uma solução de acetona/água (70:30, v/v) e misturados, também cuidadosamente e durante uma hora, ao o resíduo resultante do primeiro passo de extração. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado e adicionado ao anterior e devidamente homogeneizado. Numa etapa final, 500µL do extrato homogeneizado foram misturados com igual volume de reagente Folin-Ciocalteu (1:10; Merck, Alemanha) e 7,5mL de água. A mistura, após rápida homogeneização, foi mantida no escuro durante 10 minutos à temperatura

ambiente. Após este período foram adicionados de 1500 μ L de solução de carbonato de sódio a 20% (m/v, Sigma, USA), agitados e colocados num banho de água a 40°C (20 minutos) e depois arrefecidos. A leitura da absorvência foi feita a 755nm num leitor de placas (Spectrostar nano). A concentração dos compostos fenólicos totais foi estimada por interpolação com uma curva de calibração preparada com soluções padrão de ácido gálico (Sigma, USA), de concentração entre 0,005 e 0,1mg/mL. Os resultados foram por isso expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/100g de amostra. A metodologia mostrou linearidade entre o limite de quantificação de 40 mg/100g até 800 g/100g, com uma repetibilidade <5%.

6.3 Análise Estatística

O tratamento estatístico dos resultados obtidos teve por base o programa IBM SPSS Statistics versão 20 para o Windows (SPSS, Chicago IL, USA).

Inicialmente foi feita uma exploração com os dados analíticos para determinar se havia homogeneidade de variância e normalidade entre os resultados. Após verificar a presença de homogeneidade e normalidade foram aplicados o teste one-way ANOVA, de forma a verificar se havia diferenças significativas entre os diferentes dias de armazenamento. Nos parâmetros em que se observaram diferenças, foi aplicado o teste de Duncan de maneira a fazer uma comparação entre as médias registadas nos diferentes dias. Nas variáveis em que não se verificou homogeneidade de variância foi aplicado o teste one-way ANOVA com correção de Welch, em que as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett.

Nos parâmetros em que não se registou homogeneidade de variância e normalidade, aplicou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. Nas variáveis em que foram verificadas diferenças significativas, as medianas obtidas para os diferentes dias de armazenamento foram comparadas pelo teste Mann-Whitney U.

Capítulo 7

Resultados e Discussão

7.1 Avaliação da Estabilidade Microbiológica

As amostras de conservas de atum e sardinha correspondentes ao dia 0, 1, 2 e 7 mostraram conter <10 UFC/g de alimento (aeróbios mesófilos; dia 0), $<10^2$ UFC/g (aeróbios psicrófilos e termófilos; dia 0) e $<10^4$ UFC/g (aeróbios mesófilos, psicrófilos e termófilos; dias 1, 2 e 7). Foram assim classificadas como satisfatórias para os parâmetros estudados segundo as especificações do HPA (2009) para alimentos prontos a comer e para as subcategorias escolhidas: *alimentos estáveis à temperatura ambiente imediatamente após abertura* (dia 0) e *alimentos cozinhados e refrigerados com alguma manipulação* (dias 1, 2 e 7). Após pesquisa bibliográfica não foi possível encontrar valores referência específicos para anaeróbios sulfito-redutores mesófilos e termófilos quando enquadrados no grupo dos *alimentos cozinhados e refrigerados com alguma manipulação*. Assim, foram considerados os valores tabelados pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, 2005) para alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração, do grupo 1 (Refeições/Sandes/Bolos/Sobremesas doces com ingredientes totalmente cozinhados, ou adicionados de especiarias, ervas aromáticas secas, desidratadas ou tratadas por radiação ionizante, de produtos UHT e de maionese industrializada; ≤ 10 UFC/g de alimento). Desta forma, e tendo por base este limite para a presença de microrganismos anaeróbios sulfito-redutores, os obtidos no presente trabalho encontram-se abaixo do mesmo (INSA, 2005).

No último dia de amostragem (Dia 7), após uma semana no frigorífico, as amostras continuaram a ser classificadas como satisfatórias para todos os parâmetros estudados ($<10^4$ UFC/g para os aeróbios mesófilos, psicrófilos e termófilos; ≤ 10 UFC/g para os anaeróbios sulfito-redutores mesófilos e termófilos) (INSA, 2005; HPA, 2009). Apesar de estas amostras continuarem a ser classificadas como satisfatórias, com este tempo mais prolongado de armazenamento, foi detetado um número muito reduzido de colónias (1 a 12) de microrganismos psicrófilos e termófilos com o mesmo morfotipo na diluição 10^{-1} das amostras de conserva de sardinha ao natural, de sardinha em óleo vegetal, de atum ao natural e de atum com milho e feijão vermelho. Este resultado é compatível com uma maior oportunidade dos microrganismos crescerem durante o tempo de armazenamento, atingindo concentrações detetáveis pelo método utilizado. Estes microrganismos podem advir quer da matéria-prima usada nas conservas (peixe e/ou vegetais) quer de contaminação durante a manipulação da amostra, tal como pode acontecer na casa do consumidor.

A comparação e enquadramento dos resultados obtidos com estudos prévios foi complexa devido à escassez de dados relacionados com o tópico estudado, à diversidade de metodologias aplicadas e critérios de qualidade considerados, assim como tipos de alimentos em conserva estudados. Para além disso, a eficácia do tratamento térmico das amostras incluídas em cada estudo, associada a uma quantidade variável de microrganismos transportados pela matéria-prima, pode estar também relacionada com a divergência nos dados encontrados (Oyelese e Opatokun, 2007; Oranusi *et al.*, 2012; André *et al.*, 2013).

Por exemplo, Oranusi *et al.* (2012) avaliaram o perfil de microrganismos psicrófilos, mesófilos e termófilos deterioradores em diferentes alimentos enlatados, incluindo sardinha, dentro do prazo de validade e no momento de abertura. Neste estudo, os autores consideraram que as amostras de sardinha em conserva no momento da abertura estavam dentro dos limites de aceitabilidade considerados ($<10^6$ UFC/g; parâmetros psicrófilos, aeróbios mesófilos e termófilos), largamente acima daqueles recomendados pelo HPA e utilizados no presente trabalho para o dia 0 (<10 e $<10^2$ UFC/g). De facto, no momento de abertura, as conservas são consideradas alimentos com muito pouca flora microbiana, sendo por isso os critérios de qualidade usados pelo HPA muito mais apertados (HPA, 2009). Também Oyelese e Opatokun (2007) avaliaram conservas de sardinha de um mesmo lote, após abertura, e durante um período de 12 semanas, armazenadas no frio (4°C). A esta temperatura não foi isolado qualquer tipo de microrganismo ao longo das 12 semanas, contrastando com o armazenamento das amostras à temperatura ambiente pelos mesmos autores (2 tipos de fungos e 7 tipos de bactérias; contagem de viáveis totais entre 0,1 e $2,1 \times 10^4$ UFC/g). Apesar dos resultados de ausência de crescimento até aos 7 dias no frio ser semelhante ao nosso estudo, Oyelese e Opatokun (2007) não disponibilizaram informação detalhada relativa à estratégia metodológica usada (por exemplo, meios de cultura, temperatura e tempo de incubação, esterilidade dos recipientes usados no armazenamento), determinante para a comparação válida dos resultados.

Para além da qualidade da matéria-prima, tratamento térmico e temperatura de armazenamento eficaz, o número de microrganismos ao longo do período de conservação pode também variar consoante a higiene do recipiente de armazenamento da amostra. No nosso estudo, para os bons resultados encontrados contribuiu seguramente o uso de sacos estéreis para a conservação das amostras ao longo dos 7 dias. No entanto, estes resultados podem não se refletir na casa de todos os consumidores, uma vez que a sua higiene, desde a abertura da lata até aos recipientes de armazenamento utilizados e estado higiénico do frigorífico é muito diversificada,

podendo estar associada a uma velocidade de alteração da qualidade microbiológica do alimento variável.

7.2 Avaliação da Estabilidade Física, Química e Sensorial

7.2.1 Atum ao natural (AN)

Análise Física e Sensorial

Na Tabela 7.1 apresentam-se os resultados relativos à avaliação instrumental da cor das amostras de atum ao natural (AN), bem como da avaliação sensorial, ao longo dos 7 dias de armazenamento. Conforme referido na amostragem, foram abertas 18 latas, das quais 3 foram avaliadas no momento de abertura, correspondendo ao Dia 0 (amostra controlo), e 15 foram guardadas sob refrigeração, analisadas aleatoriamente 3 embalagens com tempos de armazenamento de 1, 2, 3, 4 e 7 dias. As amostras foram apresentadas de forma cega ao painel de provadores em dois grupos, amostras dos dias 0, 1 e 2 numa sessão e num outro dia as amostras de 3, 4 e 7 dias. No caso da cor instrumental os valores apresentados correspondem à média das medições feitas em 3 latas a cada dia ($n=3 \times 3$ para o peixe; $n=3 \times 1$ para o molho), com separação entre cor exterior e interior no peixe. Na análise sensorial também se considerou importante apresentar os resultados da cor da parte exterior e interior separadamente, uma vez que através da percepção visual pelo provador foi possível distinguir alterações na cor nas diferentes partes. Neste caso os valores apresentados correspondem à média obtida numa escala estruturada de atributos correspondendo à avaliação de 3 latas por cada um dos 7 avaliadores ($n=3 \times 7$).

Ao longo do período de armazenamento, verificou-se um ligeiro decréscimo nos parâmetros L^* e a^* , tanto na parte exterior como na parte interior. Sabendo que o valor de L^* (luminosidade) varia entre 0 (preto) e 100 (branco), verifica-se uma perda de luminosidade (mais baço). Já para o a^* , abrangendo os verdes (eixo negativo) e vermelhos (eixo positivo), os valores obtidos vão ao encontro de uma perda da cor “rosa ténue” inicial. Ambas as alterações são significativas ($p < 0,05$) logo após o primeiro dia. Apesar de no momento de abertura a luminosidade ser praticamente equivalente no exterior e interior do atum, com o decorrer dos dias verifica-se uma maior luminosidade na parte interior, mais preservada das alterações decorrentes do contacto com o ar da embalagem.

Os valores de a^* , também idênticos no momento de abertura, diminuíram mais rapidamente no exterior do que no interior, indicativo por isso de uma perda mais acentuada dos tons vermelhos característicos, provavelmente devido a oxidação. Os

Tabela 7.1 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L*, a*, b*, ΔE) e avaliação sensorial do atum ao natural (AN), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio ± desvio padrão)

Avaliação Instrumental (n=3x3/dia)		Dias de Armazenamento						p	r
		0	1	2	3	4	7		
Exterior	L*	62,3 ± 2,6 ^a	55,8 ± 2,5 ^{b,d}	54,6 ± 1,4 ^{b,c}	52,8 ± 1,7 ^c	56,8 ± 2,9 ^d	55,6 ± 2,4 ^{b,c,d}	<0,001*	-0,388**
	a*	10,9 ± 1,5 ^a	6,5 ± 0,6 ^b	6,5 ± 0,6 ^b	5,9 ± 0,5 ^b	5,0 ± 0,4 ^c	4,9 ± 0,4 ^c	<0,001**	-0,703**
	b*	17,0 ± 1,3 ^a	18,3 ± 1,8 ^{a,b}	18,2 ± 0,8 ^a	17,9 ± 1,1 ^a	16,6 ± 1,9 ^b	18,1 ± 0,5 ^a	0,013*	0,218
	ΔE	0,0 ± 0,0 ^a	8,7 ± 3,4 ^b	9,1 ± 3,3 ^b	11,1 ± 1,6 ^b	8,4 ± 1,9 ^b	9,3 ± 1,1 ^b	<0,001**	0,479**
Interior	L*	60,2 ± 1,1 ^{a,b}	56,8 ± 2,7 ^a	60,4 ± 1,6 ^b	56,6 ± 2,8 ^a	58,0 ± 3,7 ^{a,b}	58,5 ± 1,3 ^{a,b}	0,002**	-0,123
	a*	10,8 ± 1,1 ^a	8,4 ± 0,9 ^b	8,8 ± 0,8 ^b	6,8 ± 0,5 ^c	6,2 ± 0,5 ^{c,d}	5,7 ± 0,3 ^d	<0,001**	-0,840**
	b*	18,0 ± 1,0	18,0 ± 1,1	18,1 ± 0,5	18,5 ± 1,0	18,4 ± 1,0	19,4 ± 0,6	0,364	-
	ΔE	0,0 ± 0,0 ^a	4,7 ± 2,8 ^{b,c}	2,5 ± 1,4 ^b	6,3 ± 2,1 ^c	6,3 ± 2,2 ^c	6,0 ± 0,6 ^c	<0,001**	0,582**
Avaliação Sensorial (n=3x7/dia)		Dias de Armazenamento						p	
		0	1	2	3	4	7		
Alteração da Cor	Exterior	0,0 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,7 ^b	0,9 ± 1,1 ^{b,c}	1,1 ± 0,9 ^c	1,7 ± 0,7 ^d	1,8 ± 1,0 ^d	<0,001***	
	Interior	0,0 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,6 ^b	0,5 ± 0,8 ^{b,c}	0,9 ± 0,7 ^{c,d}	1,2 ± 0,7 ^{d,e}	1,5 ± 0,9 ^e	<0,001***	
Aspetto Exterior	Fibroso	0,0 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,6 ^b	0,4 ± 0,7 ^{b,c}	0,7 ± 0,7 ^c	0,4 ± 0,7 ^{b,c}	0,7 ± 0,9 ^{b,c}	0,004***	
	Perda de Brilho	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,6 ± 0,7 ^b	1,0 ± 1,2 ^b	<0,001***	
Cheiro	Oxidação	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^{a,c}	0,0 ± 0,0 ^{a,c}	0,0 ± 0,0 ^{a,c}	0,3 ± 0,7 ^{b,c}	0,3 ± 0,7 ^c	0,003***	
	Fermentação	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,6 ^b	0,3 ± 0,5 ^b	0,5 ± 0,8 ^b	0,001***	
	Pútrido	0,0 ± 0,0 ^a	0,7 ± 1,1 ^b	0,9 ± 1,2 ^b	0,8 ± 1,0 ^b	1,0 ± 1,3 ^b	1,3 ± 1,5 ^b	0,005***	
Textura	Fibrosa	0,0 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,7 ^b	1,2 ± 0,8 ^{b,c}	1,5 ± 0,8 ^c	1,5 ± 0,8 ^c	1,5 ± 0,8 ^c	<0,001***	
Sabor	Ácido	0,0 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,6 ^b	0,8 ± 1,0 ^b	1,0 ± 1,3 ^b	1,0 ± 1,0 ^b	1,0 ± 1,2 ^b	0,003***	
	Pútrido	0,0 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,7 ^b	0,5 ± 0,9 ^{b,c}	0,7 ± 1,1 ^{b,c,d}	1,1 ± 1,4 ^{c,d}	1,6 ± 1,7 ^d	0,001***	

Letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias (avaliação instrumental) e medianas (avaliação sensorial).

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

*** Valores de p de análises Kruskal-Wallis. As medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney U, quando a normalidade não foi confirmada pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

valores de a^* nas faces exterior e interior, apresentaram uma correlação fortemente negativa (-0,703 e -0,840, respetivamente) e altamente significativa ($p < 0,01$) com os dias de amostragem.

A coordenada b^* (coordenada que varia entre o azul - eixo negativo, e o amarelo - eixo positivo) apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) na parte exterior, mas evoluiu de forma pouco constante e sem correlação com o tempo de armazenamento. O ΔE , calculado de acordo com Pathare *et al.* (2013), permite demonstrar a variação total de cor ao longo do período de tempo considerado. Pela análise da Tabela 7.1 comprova-se que, tanto na parte exterior como na parte interior, houve variação de cor significativa ($p < 0,05$) no decorrer dos dias de armazenamento. Ainda de acordo com os mesmos autores, a variação da cor pode ser analiticamente classificada como muito distinta ($\Delta E > 3$), distinta ($1,5 < \Delta E < 3$) e pouco distinta ($1,5 < \Delta E$). Assim, para as amostras de AN avaliadas, a variação de cor foi muito distinta em ambas as partes logo após 24 horas no frigorífico. A redução do valor de ΔE na parte interior no segundo dia de conservação constituiu uma aparente observação isolada, associada ao elevado valor de L^* observado, idêntico ao inicial. Pelo facto de se tratarem sempre de amostras diferentes em cada dia, e pela sua variabilidade natural, poderá neste caso particular o atum ter um pouco mais de brilho.

No que respeita à análise sensorial efetuada pelo painel de provadores, verificou-se uma descoloração gradual da amostra (Figura 7.1), sendo contudo possível distinguir uma alteração mais lenta da cor na parte interior do atum, comparativamente aos valores obtidos para a parte exterior, como pode ser também comprovado pelos valores obtidos pela análise instrumental da cor (Tabela 7.1). Esta alteração da cor é naturalmente mais acentuada na parte exterior pois, após abertura da lata, esta fica mais exposta ao ar. A perda da luminosidade/brilho na parte interior do atum também foi observada, mas apenas ao quinto dia. Constata-se assim que os valores obtidos pela análise instrumental da cor do atum confirmam as alterações sensoriais detetadas pelo painel. É importante salientar que na Tabela 7.1 apenas estão mencionados os resultados obtidos para os atributos sensoriais que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).



Figura 7.1 Alteração da cor na parte exterior das amostras de Atum Natural (AN) no momento da abertura (a), após 24 horas (b) e ao fim de 7 dias (c)

Além da alteração da cor, os atributos sensoriais associados à percepção do aspeto, cheiro, textura e sabor do atum, também demonstraram que após 24 horas no frigorífico as amostras já apresentaram algum nível de deterioração: aspeto e textura mais seca/fibrosa, ligeiro cheiro a pútrido, e um sabor um pouco mais ácido e a pútrido (Tabela 7.1), alterações estas estatisticamente significativas ($p < 0,05$). É de salientar que, por exemplo, o sabor a pútrido foi progressivamente ficando mais intenso até ao último dia de análise. O painel de provadores também associou o cheiro a fermentação e oxidação a uma deterioração do produto, mas, neste caso, apenas foi detetado após 3 e 4 dias no frigorífico, respetivamente (72 e 96 horas). As variações observadas não foram, contudo, sentidas pelos provadores de forma uniforme, o que aumentou a dispersão dos resultados e diminuiu a significância das diferenças observadas.

Adicionalmente, as alterações sensoriais percebidas na amostra foram também acompanhadas por alterações no molho (Tabela 7.2). Este ficou mais turvo e espesso logo após o primeiro dia de armazenamento ($p < 0,05$), características que foram aumentando de forma não significativa até final do ensaio. A par da avaliação sensorial, foi possível detetar alterações pela medição instrumental da cor, em que apenas para o parâmetro a^* as diferenças observadas ao longo dos dias foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$), acompanhado de um acréscimo nos seus valores. Os valores de a^* correlacionaram-se com o tempo de uma forma fortemente negativa (-0,651) e altamente significativa ($p < 0,01$). Por sua vez, as restantes coordenadas demonstraram uma diminuição nos seus valores, mas de uma forma não significativa ($p > 0,05$). Contudo, o molho não foi posteriormente objeto de análise química.

Análise Química

No que respeita aos parâmetros químicos avaliados (Tabela 7.3), e pela avaliação dos valores de humidade obtidos, verifica-se que este parâmetro se manteve estável ao longo dos 7 dias de conservação a temperaturas de refrigeração, não apresentando diferenças significativas nesse mesmo período de tempo ($p > 0,05$). O valor ligeiramente superior verificado após três dias de armazenamento poderá dever-se a um escoamento do molho menos eficiente, possivelmente pela amostra estar mais “esfarelada” (aspeto e textura mais fibrosa, Tabela 7.1). Contudo, os parâmetros sensoriais relativos ao aspeto e textura fibrosa, mencionados na Tabela 7.1, não estão correlacionados com a % de humidade presente no peixe, na medida em que se tratam de amostras diferentes, para além dos atributos percecionados através da visão e da boca, estando a amostra íntegra, serem diferentes da amostra para a determinação da humidade, homogeneizada mecanicamente, ou seja, mais uniforme.

Tabela 7.2 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do molho das amostras de atum ao natural (AN), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Avaliação Instrumental (n=3/dia)	Dias de Armazenamento						p	r
	0	1	2	3	4	7		
L*	42,5 ± 3,2	37,7 ± 0,5	35,9 ± 2,3	37,4 ± 1,4	35,4 ± 4,8	34,2 ± 3,9	0,073	-
a*	-0,4 ± 0,1 ^a	-1,0 ± 0,0 ^b	-1,2 ± 0,1 ^{b,c}	-1,4 ± 0,0 ^c	-1,3 ± 0,5 ^{a,b,c}	-1,4 ± 0,2 ^{a,b,c}	<0,001**	-0,651**
b*	2,3 ± 1,1	1,0 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,4	0,8 ± 0,7	0,150	-
ΔE	0,0 ± 0,0	5,0 ± 3,6	6,8 ± 4,8	5,3 ± 2,1	7,4 ± 5,1	8,5 ± 6,2	0,248	-
Avaliação Sensorial (n=3x7/dia)	Dias de Armazenamento						p	
	0	1	2	3	4	7		
Aspeto								
Turvo	0,0 ± 0,0 ^a	0,8 ± 1,0 ^b	1,1 ± 1,0 ^b	1,1± 1,2 ^b	1,3 ± 1,2 ^b	1,5 ± 1,3 ^b	<0,001***	
Espesso	0,0 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,6 ^b	0,4 ± 0,7 ^b	0,4 ± 0,7 ^b	0,6 ± 1,0 ^b	1,0 ± 1,2 ^b	0,032***	

Letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias (avaliação instrumental) e medianas (avaliação sensorial).

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

*** Valores de p de análises Kruskal-Wallis. As medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney U, quando a normalidade não foi confirmada pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

Debruçando, agora, a atenção para os valores de pH, os valores diminuíram ligeiramente com o tempo de armazenamento, mas não foi observada uma diminuição gradual: a primeira alteração significativa ocorreu após 2 dias de refrigeração e posteriormente só no sétimo dia, finalizando com 5,24, significativamente inferior do que o valor inicial 5,83 ($p < 0,05$) (Tabela 7.3). Sensorialmente (Tabela 7.1), alguns dos provadores consideraram que as amostras apresentavam um sabor ligeiramente ácido logo após 24 horas, o qual foi aumentando de forma gradual até ao terceiro dia. Esta evolução não vai ao encontro do pH avaliado instrumentalmente, uma vez que neste caso observou-se uma ligeira oscilação ao longo do período de amostragem, com valores mais baixos ao quinto e sétimo dia, em que os provadores também consideraram as amostras mais ácidas. Apesar da avaliação do pH ser o parâmetro normalizado para controlo deste tipo de produtos, teria sido interessante analisar o valor da acidez livre, mais correlacionada com as percepções sensoriais da acidez.

O teor de ABVT foi um dos parâmetros avaliados para a determinação da deterioração ao nível proteico, sendo descrito no controlo de qualidade de peixe em geral. Os valores obtidos mantiveram-se estáveis ao longo do período de amostragem, sendo apenas observado um pequeno aumento ao segundo e último dia de armazenamento (Tabela 7.3), sem significado estatístico ($p > 0,05$). É relatado em vários estudos que o processamento a que as conservas estão sujeitas potencia um aumento no teor de ABVT do produto final (Aubourg, 2001; Shakila *et al.*, 2005), pelo que os seus níveis são maiores neste tipo de produto do que no congénere fresco. Segundo Gallardo *et al.*, 1990 (citado por Aubourg, 2001) é verificada uma tendência crescente no nível de ABVT entre as diferentes etapas de processamento, nomeadamente peixe fresco < cozinhado < enlatado. Por isso, enquanto que para o peixe fresco o limite de ABVT é de 25-30mg N/100g de peixe, para o peixe enlatado é superior, de 40-45mg N/100g de peixe (Aubourg, 2001). O Regulamento (CE) nº1022/2008 da Comissão de 17 de Outubro de 2008, determina um limite de ABVT, de 25-35mg N/100g de peixe para algumas categorias de peixe fresco. Não tendo possibilidade de conhecer os valores de ABVT do peixe fresco utilizado nestas conservas, é notório o baixo índice de degradação, mesmo após o processo de enlatamento (26mg N/100g) e adicionalmente o período de refrigeração de 7 dias deste estudo (27mg N/100g).

Tabela 7.3 Resultados obtidos nos parâmetros químicos avaliados para as amostras de atum ao natural (AN), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Parâmetros Avaliados (n=3/dia)	Dias de Armazenamento						p	r
	0	1	2	3	4	7		
Humidade (%)	75,8 \pm 0,9	75,9 \pm 1,4	75,9 \pm 0,9	77,1 \pm 1,0	76,4 \pm 0,9	75,9 \pm 0,7	0,585	-
pH	5,83 \pm 0,19 ^a	5,80 \pm 0,22 ^a	5,60 \pm 0,37 ^{a,b,c}	5,69 \pm 0,37 ^{a,b}	5,40 \pm 0,38 ^{b,c}	5,24 \pm 0,26 ^c	0,014*	-0,572**
ABVT (mg N/100g amostra)	26,1 \pm 0,2	26,9 \pm 0,7	27,4 \pm 0,2	26,0 \pm 1,0	26,2 \pm 1,1	27,3 \pm 0,2	0,083	-
Aminas biogénicas (mg/kg amostra)								
Putrescina	0,2 \pm 0,0 ^a	0,3 \pm 0,0 ^{a,b}	0,5 \pm 0,2 ^{b,c}	0,6 \pm 0,1 ^c	0,5 \pm 0,2 ^{b,c}	0,5 \pm 0,1 ^{b,c}	0,016*	0,451
Histamina	1,2 \pm 0,2 ^a	1,2 \pm 0,2 ^a	1,2 \pm 0,1 ^a	1,3 \pm 0,2 ^a	1,4 \pm 0,2 ^a	2,9 \pm 0,3 ^b	<0,001*	0,840**
Espermidina	2,3 \pm 0,5 ^a	2,3 \pm 0,3 ^a	2,3 \pm 0,0 ^a	2,6 \pm 0,2 ^{a,b}	2,3 \pm 0,1 ^a	3,0 \pm 0,2 ^b	0,026*	0,667**
Espermina	16,8 \pm 0,6 ^a	20,9 \pm 0,6 ^b	18,3 \pm 0,5 ^c	18,9 \pm 0,8 ^c	18,0 \pm 1,0 ^{a,c}	21,1 \pm 0,6 ^b	<0,001*	0,482*
Aminas Total	20,4 \pm 0,8 ^a	24,7 \pm 1,0 ^b	22,3 \pm 0,4 ^c	23,4 \pm 0,8 ^{b,c}	22,2 \pm 1,2 ^c	27,3 \pm 0,5 ^d	<0,001*	0,705**
Índice de aminas biogénicas[#]	1,4 \pm 0,2 ^a	1,6 \pm 0,0 ^{a,b}	1,7 \pm 0,2 ^{a,b}	1,9 \pm 0,1 ^b	1,8 \pm 0,3 ^b	3,2 \pm 0,2 ^c	<0,001*	0,899**
Gordura (g/100g amostra)	0,34 \pm 0,06	0,29 \pm 0,04	0,30 \pm 0,03	0,27 \pm 0,01	0,26 \pm 0,03	0,29 \pm 0,04	0,207	-
dos quais LC-PUFAs (g/100g amostra)	0,14 \pm 0,03	0,14 \pm 0,02	0,14 \pm 0,01	0,13 \pm 0,00	0,12 \pm 0,02	0,13 \pm 0,01	0,578	-
TBARS (mg MDA/kg amostra)	0,39 \pm 0,04 ^a	0,54 \pm 0,12 ^{a,c}	0,59 \pm 0,08 ^{a,c}	0,82 \pm 0,12 ^b	0,64 \pm 0,14 ^{b,c}	1,07 \pm 0,17 ^d	<0,001*	0,851**
Vitamina E (mg/100g amostra)	0,25 \pm 0,02 ^a	0,17 \pm 0,02 ^b	0,14 \pm 0,07 ^b	0,13 \pm 0,05 ^b	0,16 \pm 0,03 ^b	0,12 \pm 0,02 ^b	0,020*	-0,580*

Diferentes letras na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias.

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

[#] Corresponde à soma de Putrescina + Cadaverina + Histamina + Tiramina

Além das amins voláteis, avaliadas pelo ABVT, a quantificação da concentração de amins biogénicas presentes nas amostras também teve como fim a avaliação da deterioração proteica. Estas resultam da descarboxilação dos aminoácidos, aquando do armazenamento ou processamento dos produtos, pelo tratamento térmico ou por ação microbiana, conforme anteriormente descrito no Capítulo 3. Na Tabela 7.3 no parâmetro relativo às amins biogénicas são detalhadas as quantidades analisadas de putrescina, histamina, espermina e espermidina, não tendo sido reportados os teores de cadaverina e tiramina, por se apresentarem abaixo do limite de quantificação. Apresenta-se igualmente a concentração total de amins biogénicas e o índice de amins biogénicas, conforme descrito por Prester (2011), definidos na parte de materiais e métodos.

Das amins determinadas nas amostras de AN, a espermina foi a que apresentou valores mais altos, seguida da espermidina (Tabela 7.3). Estas duas amins biogénicas estão naturalmente presentes nos alimentos, pois a sua formação não está exclusivamente relacionada com a deterioração de origem bacteriana (Veciana-Nogués *et al.*, 1997). Por isso apresentam concentrações elevadas logo no momento de abertura. Também se verificou que todas as amins quantificadas demonstraram concentrações significativamente mais altas ($p < 0,05$) após 7 dias de armazenamento, comparativamente às concentrações no momento de abertura, como comprovado pelos valores relativos às amins individuais e ao total de amins presentes nas amostras de AN. No caso da espermidina verificou-se um aumento significativo logo no primeiro dia, a putrescina no segundo, e as restantes apenas no sétimo dia. Por sua vez, é possível constatar que ao longo dos diferentes dias não houve uma evolução gradual em todas elas, mas sim pequenas oscilações, verificando-se contudo correlações com o tempo de armazenamento para todas exceto a putrescina, com particular significado para a histamina e total de amins.

A histamina é um parâmetro de controlo obrigatório no peixe, pela sua toxicidade. São vários os limites máximos sugeridos para a presença de histamina no peixe. O Regulamento (CE) nº1441/2007 de 5 de Dezembro de 2007 refere que o limite máximo permitido para a presença de histamina em produtos de pesca de espécies de peixes associadas a um elevado teor de histidina (por exemplo peixes da família *Scombridae*) é entre 100-200mg/kg, onde se inclui o atum em estudo. De acordo com a FDA (2011) o valor máximo permitido é de 50mg/kg. Os resultados obtidos para as diferentes amins estão bastante abaixo desses limites (Tabela 7.3). Em comparação com outros estudos publicados, como o desenvolvido por Veciana-Nogués *et al.* (1997), com o objetivo de quantificar alterações entre o atum fresco e enlatado, verificaram teores mais altos no atum fresco. Os mesmos autores descrevem que as condições de pré-cozimento e

posterior tratamento térmico (esterilização) adotadas no processamento de produtos enlatados reduzem a concentração de histamina, putrescina e cadaverina. Já num estudo mais recente, descrito por Park *et al.* (2010), foi feita uma monitorização da concentração de aminas biogénicas em peixes e seus derivados consumidos na Coreia e, para o atum enlatado, os valores detetados coincidem com os resultados obtidos no presente estudo para as amostras de AN no momento de abertura.

No que respeita ao Índice de aminas biogénicas, observa-se um ligeiro acréscimo ao longo dos dias de conservação no frigorífico, acompanhado de um aumento ao sétimo dia com elevado significado estatístico ($p < 0,05$) no último dia de amostragem (3,2mg/kg no final vs 1,4mg/kg no início) (Tabela 7.3). Foi igualmente verificada também uma correlação positiva muito forte e altamente significativa entre os valores registados e o tempo de armazenamento. Segundo Prester (2011), índices < 50 mg/kg indicam que o atum, neste caso, apresenta uma qualidade aceitável, enquanto que índices > 50 e > 90 mg/kg indicam um estado inicial ou avançado de decomposição, respetivamente. Assim, confirma-se que durante o decorrer do tempo de armazenamento das amostras no frigorífico, os índices de aminas biogénicas estiveram dentro do limite considerado como sendo de boa qualidade.

Adicionalmente, é possível correlacionar os parâmetros relativos à determinação do ABVT e aminas biogénicas com os resultados microbiológicos e sensoriais. Microbiologicamente, e, como já foi explicado, as amostras de AN foram consideradas como satisfatórias durante os 7 dias de armazenamento, tendo por base a avaliação de diferentes microrganismos, estando os valores do índice de aminas biogénicas de acordo com os resultados microbiológicos obtidos. No que respeita à avaliação sensorial, após 24 horas e até ao fim dos 7 dias no frigorífico o cheiro e sabor a pútrido foi identificado nas amostras. Tal facto pode ser relacionado com a presença, mesmo em baixas concentrações e dentro dos limites máximos de aceitabilidade, de putrescina e aminas voláteis, respetivamente.

A deterioração da fração lipídica foi outro dos itens incluídos na avaliação da qualidade de conservas após abertura. Tem sido relatado em vários artigos científicos que aquando do processamento de espécies marinhas a altas temperaturas ocorrem danos ao nível dos ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), levando à formação de produtos de oxidação primários e secundários (Selmi e Sadok, 2007; Gladyshev *et al.*, 2009; Naseri *et al.*, 2011). Contudo, não se encontram estudos após abertura, o objetivo do presente estudo. Pela observação da Tabela 7.3 é possível verificar que não ocorreu alteração no teor total em gordura e que este é muito reduzido. A quantidade de PUFAs

de cadeia longa (LC-PUFAs), não apresentou variações significativas ao longo do período de conservação no frigorífico (Tabela 7.3), representando, em média, 46% do teor lipídico, sendo sempre maioritário o EPA (40%), seguido do DHA (5%), e sendo muito reduzido no DPA (0,6%). Estas observações levam-nos a constatar que a abertura da lata e o seu acondicionamento num recipiente fechado, mantido durante 7 dias a temperaturas de refrigeração não incrementou a oxidação da fração lipídica, com tão elevado valor nutricional. Contudo, não conhecendo o teor inicial de lípidos nesta amostra, em fresco, este valor reduzido pode ser efetivamente característico do peixe utilizado, ou ocorrer uma cedência para o molho. De facto, após abertura as condições de conservação são diferentes das iniciais, porque o peixe já não se apresenta tão compacto como no interior da lata e, ao verter para a embalagem de plástico, a área de contacto entre o atum e o molho, neste caso água e sal, aumenta. Naseri *et al.* (2011) descrevem que o meio líquido envolvente ao peixe pode alterar o perfil de ácidos e a extração parcial de alguns componentes. No caso do estudo publicado por Siriamornpun *et al.* (2008), em que foram avaliadas alterações do conteúdo lipídico de conservas de atum ao natural ao longo de 12 meses de armazenamento à temperatura ambiente, os autores concluíram que a concentração dos PUFAs.

Pela análise dos valores obtidos na quantificação dos produtos secundários de oxidação lipídica pelo método TBARS (Tabela 7.3) verifica-se que houve um aumento gradual e estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no teor de TBARS entre as 24 horas após abertura da lata e até ao terceiro dia de armazenamento, seguido de um ligeiro decréscimo ao quarto dia e posterior aumento ao último dia. Estes valores são indicativos de oxidação lipídica. Além disso, verifica-se também uma correlação positiva muito forte e altamente significativa entre os valores de TBARS obtidos com o tempo de armazenamento. De acordo com alguns autores, a salmoura (molho contendo água e sal utilizado nas conservas de atum ou sardinha ao natural) provoca um aumento na oxidação lipídica da fração dos PUFAs, principalmente pelo teor de iões metálicos libertados pelos complexos heme-proteína e pela pressão criada na etapa de esterilização (Siriamornpun *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 1998). É de realçar que ao quarto dia o valor de TBARS foi acompanhado de um decréscimo, que coincide com uma pequena diminuição no valor da % de gordura e de PUFAs também verificada no mesmo dia, salientando-se que esta variação poderá ser maioritariamente devida a variações naturais no próprio produto e não a uma alteração ocorrida pelos 5 dias de armazenamento. Os resultados obtidos no presente estudo no momento de abertura são ligeiramente superiores aos tabelados no trabalho desenvolvido por Aubourg (1998) mas inferiores ao reportado por Siriamornpun *et al.* (2008), com 0,75mg MDA/kg.

Ainda nos parâmetros avaliados para a determinação da deterioração lipídica, a vitamina E, onde foi detetado apenas α -tocoferol, demonstrou uma diminuição logo após 1 dia no frigorífico (Tabela 7.3), redução esta estatisticamente significativa ($p < 0,05$). No decorrer dos restantes dias de armazenamento não ocorreu uma evolução gradual, mas sim uma oscilação, apesar dos valores registados neste período de tempo serem também baixos, comparativamente ao momento de abertura. A vitamina E é muito importante sob o ponto de vista tecnológico, na medida em que contribui bastante para a integridade dos compostos lipofílicos presentes no alimento pela sua ação antioxidante. A sua diminuição com o tempo de armazenamento após abertura poderá dever-se à sua utilização como antioxidante, nomeadamente na proteção dos PUFA's da oxidação, razão pela qual não se verificou alterações significativas nestes.

7.2.2 Atum em óleo vegetal (AO)

Análise Física e Sensorial

Os resultados relativos à análise instrumental e sensorial da cor de atum em óleo vegetal (AO), expostos na Tabela 7.4, correspondem a uma amostragem realizada nas mesmas condições das amostras das conservas de atum ao natural (AN).

Tanto na parte exterior como na parte interior verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) nos parâmetros L^* e a^* , traduzidos por uma redução na luminosidade e nos tons vermelhos ao longo dos dias de armazenamento, logo após o primeiro dia. Na parte exterior e interior, os valores de a^* correlacionaram-se com o tempo de armazenamento de forma fortemente negativa (-0,781 e -0,857, respetivamente) e altamente significativa ($p < 0,01$). Neste produto a luminosidade foi semelhante no interior e exterior mas a intensidade dos vermelhos manteve-se mais forte no interior, o que leva a comprovar que a deterioração a nível da cor na parte interior ocorre de forma menos intensa. Mais uma vez os valores de b^* variaram pouco ou oscilaram em torno de um valor central pelo que, apesar de se verificarem pontualmente algumas variações significativas entre dias no interior, estas não se correlacionam com o tempo (Tabela 7.4). Adicionalmente a estas coordenadas, também foi avaliada a variação total da cor, ΔE , em que em ambas as partes do atum sujeitas à medição instrumental se constatou a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), bem como um aumento também significativo logo após 24 horas, seguido de um comportamento constante até ao último dia de armazenamento. É de ressaltar o facto que de acordo com Pathare *et al.* (2013) a variação observada para as amostras de AO após 1 dia no frigorífico foi muito distinta, visto que o $\Delta E > 3$, sendo o valor registado na parte exterior superior ao da parte interior.

Tabela 7.4 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do atum em óleo vegetal (AO), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Avaliação Instrumental ($n=3 \times 3/\text{dia}$)		Dias de Armazenamento						p	r
		0	1	2	3	4	7		
Exterior	L^*	59,1 \pm 2,5 ^a	47,7 \pm 3,0 ^{b,c}	49,3 \pm 1,7 ^b	46,9 \pm 2,7 ^c	47,4 \pm 1,1 ^{b,c}	46,5 \pm 1,8 ^c	<0,001*	-0,590**
	a^*	8,5 \pm 0,9 ^a	7,6 \pm 1,0 ^b	6,5 \pm 0,5 ^c	5,5 \pm 0,4 ^d	6,2 \pm 0,5 ^c	5,0 \pm 0,7 ^d	<0,001*	-0,781**
	b^*	19,1 \pm 3,0	17,5 \pm 2,3	18,8 \pm 1,2	17,1 \pm 1,9	17,9 \pm 0,8	17,1 \pm 1,1	0,141	-
	ΔE	0,0 \pm 0,0 ^a	13,1 \pm 2,6 ^b	10,3 \pm 3,1 ^b	13,2 \pm 2,9 ^b	12,5 \pm 2,6 ^b	13,6 \pm 3,3 ^b	0,001**	0,567**
Interior	L^*	54,5 \pm 3,3 ^a	51,6 \pm 2,2 ^{a,b}	49,6 \pm 1,9 ^{a,b,c}	48,6 \pm 1,4 ^{b,c}	47,9 \pm 0,9 ^c	47,6 \pm 0,7 ^c	<0,001**	-0,685**
	a^*	9,6 \pm 0,7 ^a	9,2 \pm 0,7 ^a	7,7 \pm 0,9 ^b	6,9 \pm 0,7 ^c	7,3 \pm 0,3 ^{b,c}	5,7 \pm 0,5 ^d	<0,001*	-0,857**
	b^*	18,4 \pm 1,4 ^{a,c}	18,1 \pm 1,9 ^{a,b,c}	19,5 \pm 1,0 ^{a,c}	16,0 \pm 1,1 ^b	18,0 \pm 0,7 ^c	18,5 \pm 0,5 ^c	<0,001**	-0,017
	ΔE	0,0 \pm 0,0 ^a	5,4 \pm 2,3 ^b	6,1 \pm 2,5 ^b	7,3 \pm 2,4 ^b	7,4 \pm 3,2 ^b	7,7 \pm 2,2 ^b	<0,001**	0,577**
Avaliação Sensorial ($n=3 \times 7/\text{dia}$)		Dias de Armazenamento						p	
		0	1	2	3	4	7		
Alteração da Cor	Exterior	0,0 \pm 0,0 ^a	0,5 \pm 0,5 ^b	1,1 \pm 0,8 ^c	1,1 \pm 0,8 ^c	1,7 \pm 1,0 ^{c,d}	2,0 \pm 1,2 ^d	<0,001***	
	Interior	0,0 \pm 0,0 ^a	0,3 \pm 0,6 ^b	0,3 \pm 0,5 ^b	0,9 \pm 0,5 ^c	1,5 \pm 0,5 ^d	2,0 \pm 0,3 ^e	<0,001***	
Aspetto Exterior	Perda de Brilho	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,4 ^b	0,6 \pm 0,8 ^{b,c}	0,8 \pm 0,8 ^c	1,4 \pm 1,0 ^d	<0,001***	
Cheiro	Oxidação	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,4 ^a	0,6 \pm 0,7 ^b	<0,001***	
	Pútrido	0,0 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,4 ^{a,b}	0,4 \pm 0,7 ^{b,c}	0,6 \pm 0,9 ^{b,c}	0,6 \pm 1,1 ^{b,c}	1,1 \pm 1,5 ^c	0,014***	
Textura	Fibrosa	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,4 \pm 0,5 ^b	0,8 \pm 0,7 ^b	1,2 \pm 0,8 ^c	1,5 \pm 0,9 ^c	<0,001***	
Sabor	Ácido	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,4 \pm 0,6 ^b	1,0 \pm 1,1 ^b	<0,001***	
	Pútrido	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,4 ^a	0,6 \pm 0,9 ^b	0,6 \pm 0,8 ^b	0,9 \pm 1,1 ^b	<0,001***	

Letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias (avaliação instrumental) e medianas (avaliação sensorial).

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

*** Valores de p de análises Kruskal-Wallis. As medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney U, quando a normalidade não foi confirmada pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

Relativamente à análise sensorial realizada pelo painel (Tabela 7.4), e tal como nas amostras de AN, os provadores verificaram a perda da cor característica, observada no momento de abertura da lata, logo após 24 horas no frigorífico, tanto na parte exterior como na parte interior. Em contrapartida, e tal como na avaliação instrumental, a análise sensorial demonstrou alterações menos intensas na parte interior do atum. Em ambas as partes as diferenças detetadas sensorialmente foram estatisticamente significativas ($p<0,05$). A perda de luminosidade/brilho também foi correlacionada pelos avaliadores com uma perda da qualidade do produto, em que apesar de só ser detetada após 2 dias de armazenamento, vai ao encontro dos resultados obtidos na coordenada L^* aquando da avaliação instrumental da cor.

Pela análise da Tabela 7.4 é possível constatar que, para além dos atributos relacionados com a cor e a luminosidade, a textura, cheiro e sabor também apresentaram alterações no decorrer do período de armazenamento. No que respeita à textura, esta ficou mais seca/fibrosa após 2 dias no frigorífico, verificando-se um aumento significativo ($p<0,05$) ao longo dos restantes dias. O mesmo comportamento foi observado para os atributos relacionados com o cheiro e sabor, em que foi percebido pelos provadores um ligeiro cheiro a oxidação no último dia de amostragem e a pútrido após 48 horas, e um sabor um pouco mais ácido e a pútrido após 4 e 3 dias, respetivamente. Estes atributos sensoriais foram intensificando-se com o tempo de armazenamento. É de salientar que contrariamente às amostras de AN em que o sabor ácido e pútrido foi detetado logo após 24 horas (Tabela 7.1), nas amostras de AO as mesmas características sensoriais foram identificadas mais tarde, o sabor ácido passado 4 dias de armazenamento e o sabor pútrido após 2 dias (Tabela 7.4).

Na Tabela 7.5 são apresentados os resultados relativos à avaliação instrumental e sensorial do molho. Após 2 e 3 dias foram observadas alterações sensoriais, em que o molho foi considerado mais líquido e mais turvo, respetivamente. A par destas diferenças significativas ($p<0,05$) verificadas na análise sensorial a nível do aspeto, a análise instrumental foi acompanhada por alterações na cor, particularmente nas coordenadas a^* e b^* , em que a^* demonstra uma correlação negativa muito forte e altamente significativa no decorrer dos diferentes dias de análise. Na verdade, é observado um aumento nos valores de ΔE logo após 24 horas e uma continuidade desse acréscimo, sendo este comportamento confirmado estatisticamente ($p<0,05$), verificando-se uma correlação fortemente negativa e altamente significativa. A variação registada após 24 horas pode ser classificada analiticamente como distinta, uma vez que se situa entre $1,5<\Delta E<3$ (Pathare *et al.*, 2013), apesar de nos dias posteriores já ser considerada como muito distinta ($\Delta E>3$).

Tabela 7.5 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do molho das amostras de atum em óleo vegetal (AO), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Avaliação Instrumental (n= 3/dia)	Dias de Armazenamento						p	r
	0	1	2	3	4	7		
L*	43,5 ± 0,5	42,6 ± 2,2	43,0 ± 1,3	41,8 ± 1,6	42,7 ± 1,6	44,5 ± 2,0	0,510	-
a*	-0,4 ± 0,0 ^a	-0,5 ± 0,0 ^{a,b}	-0,5 ± 0,1 ^{a,b}	-0,5 ± 0,1 ^b	-0,5 ± 0,0 ^b	-0,7 ± 0,0 ^c	<0,001*	-0,895**
b*	7,2 ± 0,3 ^a	7,3 ± 0,4 ^a	10,6 ± 2,0 ^b	11,5 ± 1,3 ^b	10,7 ± 0,5 ^b	10,8 ± 1,2 ^b	0,001*	0,624**
ΔE	0,0 ± 0,0 ^a	1,6 ± 1,3 ^{a,b}	3,6 ± 1,8 ^{b,c}	4,8 ± 1,5 ^c	3,9 ± 0,3 ^c	4,1 ± 1,2 ^c	0,003*	0,632**
Avaliação Sensorial (n=3x7/dia)	Dias de Armazenamento						p	
	0	1	2	3	4	7		
Aspeto								
Turvo	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,4 ^b	0,1 ± 0,4 ^{a,b}	0,5 ± 0,5 ^c	<0,001***	
Espesso	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,4 ^{a,b}	0,1 ± 0,2 ^a	0,3 ± 0,5 ^{b,c}	0,4 ± 0,5 ^c	<0,001***	

Letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias (avaliação instrumental) e medianas (avaliação sensorial).

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

*** Valores de p de análises Kruskal-Wallis. As medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney U, quando a normalidade não foi confirmada pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

Análise Química

A humidade do atum, foi inferior à observada no atum ao natural, e apresentou, contrariamente a este, variações significativas (Tabela 7.6). É possível verificar que após 24 horas no frigorífico houve um decréscimo estatisticamente significativo ($p < 0,05$) mantendo-se praticamente sem alterações até final do estudo e, apresentando, por isso, uma correlação fraca com o tempo de armazenamento. Desta forma, é de realçar a diminuição observada no segundo dia de análise, a qual pode ser justificada pelo facto desta amostra (AO), ser muito diferente no que respeita às características do molho das amostras de AN, além do “ambiente de conservação” (passagem do conteúdo da lata para o recipiente de plástico) e do contacto do atum com o molho (na lata o molho está maioritariamente à superfície e no recipiente de plástico está maioritariamente no fundo da embalagem) também ser diferente. Neste caso a humidade é unicamente devida à própria água contida no peixe porque o molho é óleo vegetal. Durante o enlatamento o atum é colocado no fundo da embalagem e o óleo é colocado na parte superior, ocorrendo trocas na superfície do atum durante o tempo de armazenamento. Ao alterar a área de contacto entre o atum e o molho, por transferência para as embalagens usadas na refrigeração, aumentaram-se a área de superfície do atum em contacto com o óleo, sendo esse efeito visível após algum tempo de contacto. Assim, deverá ter ocorrido passagem de água para o molho com entrada de óleo no atum, originando melhor percentagem de água. Esta observação está coerente com a avaliação sensorial do molho (Tabela 7.5) onde os provadores caracterizaram o molho como estando mais líquido e mais turvo (pela imiscibilidade). Os parâmetros sensoriais relativos ao aspeto e textura fibrosa (Tabela 7.4) não se correlacionam com a % de humidade (Tabela 7.6).

No que toca aos valores de pH apresentados na Tabela 7.6, verifica-se que estes se mantêm estáveis até ao terceiro dia de armazenamento, seguido de uma ligeira diminuição nos 2 dias posteriores, sendo o valor do último dia (5,51) significativamente mais baixo ($p < 0,05$) que no primeiro dia (5,76). Ainda assim, os valores apresentam entre si uma correlação fortemente negativa (-0,619) e altamente significativa ($p < 0,01$) com o tempo de armazenamento. Adicionalmente, é de frisar o facto de quimicamente os valores mais baixos de pH serem observados nos 2 últimos dias, sendo também neste período de tempo em que sensorialmente o sabor do atum foi caracterizado como mais ácido. Os valores de pH foram superiores e mais estáveis do que os observados com o atum em óleo.

Tabela 7.6 Resultados obtidos nos parâmetros químicos avaliados para as amostras de atum em óleo vegetal (AO), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Parâmetros Avaliados (n=3/dia)	Dias de Armazenamento						p	r
	0	1	2	3	4	7		
Humidade (%)	62,3 \pm 1,4 ^a	56,7 \pm 1,6 ^b	54,3 \pm 0,9 ^c	56,2 \pm 1,3 ^{b,c}	55,9 \pm 1,1 ^{b,c}	56,8 \pm 0,6 ^b	<0,001*	-0,397
pH	5,76 \pm 0,09 ^{a,b}	5,74 \pm 0,09 ^{a,b}	5,81 \pm 0,10 ^{a,b}	5,84 \pm 0,07 ^a	5,72 \pm 0,06 ^b	5,51 \pm 0,06 ^c	<0,001*	-0,619**
ABVT (mg N/100g amostra)	31,3 \pm 0,6	30,9 \pm 1,3	29,2 \pm 0,2	30,6 \pm 1,1	30,0 \pm 0,4	30,2 \pm 0,3	0,062	-
Aminas biogénicas (mg/kg amostra)								
Putrescina	0,5 \pm 0,2 ^a	1,4 \pm 0,2 ^{b,c}	1,4 \pm 0,2 ^{b,c}	1,0 \pm 0,1 ^b	1,1 \pm 0,1 ^{b,c}	1,5 \pm 0,4 ^c	0,001*	0,470*
Histamina	0,4 \pm 0,1	0,5 \pm 0,0	0,5 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,7 \pm 0,3	0,513	-
Espermidina	2,2 \pm 0,7	3,4 \pm 0,1	3,1 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1	3,4 \pm 0,2	3,1 \pm 0,6	0,053	-
Espermina	9,9 \pm 2,3 ^a	12,3 \pm 1,0 ^b	13,0 \pm 0,6 ^b	13,9 \pm 0,6 ^b	14,2 \pm 1,2 ^b	12,3 \pm 0,5 ^b	0,012*	0,374
Aminas Total	13,3 \pm 0,5 ^a	18,1 \pm 0,7 ^b	18,0 \pm 0,4 ^b	18,6 \pm 0,3 ^b	19,2 \pm 1,4 ^b	18,3 \pm 0,6 ^b	<0,001*	0,564*
Índice de aminas biogénicas[#]	0,9 \pm 0,1 ^a	1,9 \pm 0,2 ^b	1,9 \pm 0,1 ^b	1,6 \pm 0,2 ^b	1,6 \pm 0,1 ^b	2,2 \pm 0,7 ^b	0,006*	0,542*
Gordura (g/100g amostra)	6,42 \pm 0,85 ^a	18,46 \pm 2,69 ^{b,c}	21,45 \pm 0,70 ^c	13,54 \pm 2,27 ^d	20,85 \pm 1,35 ^{b,c}	17,15 \pm 3,36 ^{b,d}	<0,001*	0,382
dos quais LC-PUFAs (g/100g amostra)	0,30 \pm 0,06	0,30 \pm 0,10	0,37 \pm 0,14	0,14 \pm 0,04	0,35 \pm 0,07	0,35 \pm 0,12	0,094	-
TBARS (mg MDA/kg amostra)	0,39 \pm 0,08 ^a	0,42 \pm 0,06 ^{a,b}	0,50 \pm 0,12 ^{a,b}	0,40 \pm 0,07 ^a	0,58 \pm 0,09 ^b	0,76 \pm 0,11 ^c	0,002*	0,801**
Vitamina E (mg/100g amostra)	6,75 \pm 0,18 ^a	18,05 \pm 1,85 ^b	20,36 \pm 0,19 ^b	18,62 \pm 0,66 ^b	19,42 \pm 0,62 ^b	17,73 \pm 1,54 ^b	<0,001**	0,479*

Diferentes letras na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias.

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

[#] Corresponde á soma de Putrescina + Cadaverina + Histamina + Tiramina

Além do pH, o ABVT também foi um parâmetro químico avaliado, tendo por vista a avaliação da deterioração ao nível da fração proteica. Pela análise da Tabela 7.6 é possível constatar que não foram observadas diferenças com significado estatístico ($p>0,05$) ao longo dos diferentes dias, sendo acompanhado por um comportamento constante. No trabalho desenvolvido por Shakila *et al.* (2005), para conservas de atum (*Katsuwonus pelamis*) em óleo, os autores verificaram que o teor em ABVT variou entre 20-35mg N/100g de peixe após 6 horas à temperatura ambiente, valores estes superiores aos obtidos nas amostras de atum fresco. Tal como salientado anteriormente, o enlatamento/esterilização potencia um aumento no teor de ABVT. No presente estudo obtiveram-se resultados entre os 29-31mg N/100g de peixe para as amostras de AO, que de acordo com os valores limite citados por Aubourg (2001) (40-45mg N/100g de peixe) são classificadas como satisfatórias no período de tempo considerado. Por outro lado, verifica-se que são ligeiramente superiores aos observados nas amostras de AN (Tabela 7.3).

Analisando agora o comportamento das aminas biogénicas, a sua concentração, quer individual quer no seu total, foi acompanhada por algumas flutuações ligeiras no caso da putrescina e um aumento significativo ($p<0,05$) após 24 horas no caso da espermina e aminas totais, cujos valores se mantiveram posteriormente estáveis até ao último dia de armazenamento, apresentando uma reduzida correlação temporal (Tabela 7.6). A histamina e espermidina não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$). Comparando estes níveis com os obtidos nas amostras de AN (Tabela 7.3) verifica-se um menor teor de aminas biogénicas no atum em óleo. No caso das amostras de AN em que o molho consiste numa salmoura (água e sal) a ocorrência de alterações no que toca à deterioração por aminas biogénicas é mais intensa. Assim, o óleo parece contribuir para uma menor degradação proteica. Os valores obtidos estão, tal como as amostras de AN, bastante abaixo dos limites máximos sugeridos pelo Regulamento (CE) nº1441/2007 (100-200mg/kg), bem como pela FDA (2011) (50mg/kg) para a presença de histamina no peixe, incluindo conservas. Fazendo uma comparação do presente trabalho com outros estudos publicados, verifica-se que os valores vão ao encontro do intervalo de resultados tabelados nesses mesmos estudos para amostras de atum enlatado, apesar de por vezes serem observadas pequenas variações entre eles (Veciana-Nogués *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2010). A título de exemplo, tendo por base o valor médio de espermina mensurado para o produto final no momento de abertura, descrito por Veciana-Nogués *et al.* (1997), de 10,8mg/kg, vai ao encontro do valor registado na Tabela 7.6 para as amostras de AO no primeiro dia de análise, equivalente ao momento de abertura da lata. Os valores observados nos dias posteriores já são mais

altos, mas tal deve-se ao facto de durante esse período de tempo as condições de armazenamento não serem as mesmas e serem criadas condições para uma potencial alteração, comparativamente às do produto inicial (sem abertura da lata). Já no que respeita ao trabalho desenvolvido por Park *et al.* (2010) o resultado já se encontra abaixo do valor médio tabelado (4,4mg/kg).

Adicionalmente, e pela observação da na Tabela 7.6, o índice de amins biogénicas variou de forma estatisticamente significativa ($p<0,05$). Observa-se um acréscimo no seu valor (equivalente a redução de qualidade) logo após 24 horas (1,9), sendo significativamente mais elevado que o obtido no momento da abertura (0,9) e mantendo-se com pequenas alterações até aos 7 dias de armazenamento (2,2). Seguindo os mesmos índices de referência (Prester, 2011), as amostras de AO apresentam uma qualidade aceitável em qualquer momento de análise ($<50\text{mg/kg}$).

O teor de amins biogénicas e amins voláteis é usualmente relacionado com as condições microbiológicas e sensoriais do produto. Visto que não foi verificado um aumento no teor de ABVT ao longo dos dias de armazenamento, foi dado mais ênfase à concentração de amins biogénicas, em que foi observado um acréscimo, mesmo estando abaixo dos limites máximos para a sua presença. Pela análise microbiológica, as amostras de AO foram classificadas com um nível satisfatório em qualquer momento de análise do período de tempo considerado, estando os valores do índice de amins biogénicas coincidentes com a qualidade microbiológica do produto. A nível sensorial os provadores identificaram o cheiro e sabor a pútrido nas amostras de AO após 1 e 2 dias no frigorífico, respetivamente (Tabela 7.5). Estes atributos sensoriais podem estar relacionados, tal como nas amostras de AN, com a presença de putrescina, mesmo em baixas concentrações, ou com o teor de ABVT, estando este também dentro dos limites máximos de aceitabilidade.

A par dos parâmetros químicos descritos para as amostras de AO, a fração lipídica também foi alvo de avaliação. Pela análise da Tabela 7.6 verifica-se que a % gordura do atum registada no momento de abertura foi a mais baixa (6,4%), seguida de um aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) após 24 horas para 18,5%, acompanhada posteriormente por ligeiras oscilações até ao último dia de conservação, com 17,1%. O acréscimo observado logo após 1 dia no frigorífico é coerente com a observação anterior relativa à perda de água. Na abertura da conserva o atum está mais compacto, e a área em contacto com o molho aumenta após abertura e transferência para as embalagens onde as amostras foram refrigeradas, e que pretenderam simular o que ocorreria em casa do consumidor.

No que respeita à quantidade de PUFA's de cadeia longa (LC-PUFA's) por 100g de peixe, exclusivamente de origem marinha, estes mantiveram constantes ao longo do período de armazenamento, com cerca de 300 mg/100g, não tendo sido demonstradas diferenças significativas nos seus valores ($p < 0,05$) (Tabela 7.6), o que leva a confirmar que a abertura da lata e a conservação do seu conteúdo num recipiente apropriado ao longo de 7 dias no frigorífico não levou a alterações nesta fração lipídica, com grande interesse nutricional. Contudo, apesar da relação EPA:DHA ser equivalente à verificada no atum ao natural (cerca de 1:8), a percentagem de LC-PUFA's reduziu para apenas 2% dos lípidos totais, em média, pela “diluição” nos lípidos do óleo vegetal utilizado como molho. Assim, apesar do teor em PUFA's totais ser mais elevado do que no atum ao natural (58% vs 53%), no caso do atum em óleo este é maioritariamente suportado pelos PUFA's do óleo, nomeadamente ácido linoleico (50% dos lípidos totais). Esta observação suporta o estudo publicado por Stephen *et al.* (2010), cujo objetivo incidiu na avaliação de alterações químicas aquando do processamento de atum por diferentes vias de confeção, comparativamente ao atum fresco, nomeadamente cozedura, fritura, por microondas e conservas, onde os autores constataram que pelo processo de conserva o teor total de ácidos gordos polinsaturados aumentou, devido à absorção de óleo usado no enchimento no decorrer do processamento.

A avaliação do teor de TBARS permitiu determinar qual o comportamento dos produtos secundários de oxidação lipídica no decorrer do período de armazenamento. Na Tabela 7.6 são verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos seus valores, em que se observa também uma correlação positiva muito forte (0,801) e estatisticamente significativa ($p < 0,01$) com o tempo de armazenamento, sendo registado o valor mais elevado após 7 dias no frigorífico, de 0,76mg MDA/kg, apesar de ao terceiro dia ter sido verificada uma ligeira diminuição, talvez devido a uma menor % de compostos lipídicos presente nas amostras avaliadas nesse dia. Este decréscimo pontual deve-se principalmente a variações das características intrínsecas do próprio produto. Comparativamente às amostras de AN (Tabela 7.3), as de AO apresentaram um nível de oxidação lipídica inferior no período de tempo considerado, apesar do maior teor lipídico.

A vitamina E nas amostras de AO era composta por α , γ e δ -tocoferol, sendo maioritário o γ -tocoferol, seguido do δ -tocoferol, e por fim o α -tocoferol (não apresentado). Pelos valores de vitamina E observados na Tabela 7.6 para as amostras de AO, constata-se um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) após 24 horas de armazenamento, mantendo-se constante até final. Tal como no caso do teor de gordura, em que também se verificou este aumento no mesmo período de tempo devido à

absorção de óleo vegetal pelo atum, pode ser dada a mesma explicação relativamente ao teor de vitamina E. É importante frisar que os óleos vegetais são naturalmente mais ricos em vitamina E que o atum, pelo que a absorção de óleo conduz naturalmente a um incremento na vitamina E, na sua composição, e na capacidade de resistência à oxidação do produto. O facto de o perfil de vitamina E se ter alterado simultaneamente corrobora esta explicação, uma vez que o teor em γ -tocoferol, característico do óleo utilizado, aumentou exponencialmente, de 2,8mg/100g no momento de abertura para 3,9mg/100g no segundo dia, representando 68% do total de vitamina E (não apresentado). Assim, mesmo com um acréscimo de lípidos no atum pela presença do óleo vegetal, é de referir a “barreira” que este tipo de molho criou na proteção da oxidação dos ácidos gordos insaturados, provavelmente pelo teor elevado de vitamina E. Estas observações são coerentes com o observado por Medina *et al.* (1998) que estudaram o efeito do tipo de molho na oxidação lipídica do atum enlatado, em particular com azeite refinado, óleo de soja e salmoura. Os autores verificaram que a salmoura favoreceu a oxidação lipídica e que o óleo de soja, pela sua riqueza em vitamina E, e o azeite, pelos compostos fenólicos, conferiram proteção à oxidação dos PUFA.

7.2.3 Atum com milho e feijão vermelho (AV)

Análise Física e Sensorial

Para as amostras de atum com milho e feijão vermelho (AV) foi feita a avaliação sensorial do atum e dos vegetais, separadamente, detalhada nas tabelas 7.7 e 7.8, respetivamente. De salientar, mais uma vez, que na componente sensorial avaliada pelo painel de provadores apenas se apresentam os atributos onde foram detetadas alterações ao longo do tempo de estudo.

Pela análise da Tabela 7.7, relativa à avaliação instrumental da cor e avaliação sensorial dos atributos considerados no atum, é possível observar que, tanto na parte exterior como na parte interior do atum, as coordenadas L^* e a^* demonstraram diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do período de armazenamento, sendo evidenciada uma correlação fortemente negativa e altamente significativa com o tempo no L^* exterior e a^* interior, equivalente a perda de luminosidade e de tons vermelhos, em sintonia com o que já tinha sido verificado nas amostras anteriores. No que respeita ao ΔE constata-se uma variação total da cor significativa logo após as primeiras 24 horas, seguida de um comportamento constante no decorrer dos restantes dias. Apesar de nas duas partes de atum consideradas a variação ocorrida ser considerada analiticamente muito distinta, $\Delta E > 3$, (Pathare *et al.*, 2013), esta é superior na parte exterior, e apresenta valores semelhantes aos verificados no atum ao natural.

Tabela 7.7 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do atum com milho e feijão vermelho (AV), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Avaliação Instrumental (n=3x3/dia)		Dias de Armazenamento						<i>p</i>	<i>r</i>
		0	1	2	3	4	7		
Parte Exterior	L^*	58,7 \pm 3,5 ^a	54,0 \pm 3,1 ^b	50,4 \pm 2,9 ^{c,d}	52,8 \pm 3,1 ^{b,c}	48,7 \pm 1,7 ^d	49,2 \pm 1,8 ^d	<0,001*	-0,629**
	a^*	10,5 \pm 1,0 ^a	8,0 \pm 0,7 ^b	7,7 \pm 0,5 ^b	6,8 \pm 0,4 ^c	7,7 \pm 1,1 ^b	7,3 \pm 0,7 ^{b,c}	<0,001*	-0,557**
	b^*	19,8 \pm 1,5	20,0 \pm 2,6	18,6 \pm 1,0	19,4 \pm 1,2	18,2 \pm 1,6	17,2 \pm 3,6	0,065	-
	ΔE	0,0 \pm 0,0 ^a	6,7 \pm 4,6 ^b	9,4 \pm 5,6 ^b	8,2 \pm 4,6 ^b	11,5 \pm 2,3 ^b	11,0 \pm 3,0 ^b	<0,001**	0,562**
Parte Interior	L^*	55,8 \pm 2,1 ^a	54,6 \pm 1,9 ^{a,b}	52,3 \pm 3,3 ^{a,b,c}	50,9 \pm 3,2 ^{b,c}	51,8 \pm 3,0 ^{a,b,c}	50,7 \pm 1,0 ^c	<0,001**	-0,524**
	a^*	10,0 \pm 1,1 ^a	8,5 \pm 0,4 ^{a,b}	7,7 \pm 0,7 ^{b,c}	7,7 \pm 0,1 ^c	7,3 \pm 0,5 ^c	7,4 \pm 0,3 ^c	<0,001**	-0,661**
	b^*	19,8 \pm 0,8 ^a	20,4 \pm 1,7 ^{a,b}	19,8 \pm 1,6 ^{a,b}	18,4 \pm 0,5 ^b	19,8 \pm 1,6 ^{a,b}	19,9 \pm 0,7 ^a	0,001**	-0,065
	ΔE	0,0 \pm 0,0 ^a	3,4 \pm 1,6 ^b	4,6 \pm 2,0 ^b	6,0 \pm 2,2 ^b	6,0 \pm 3,5 ^b	6,1 \pm 3,0 ^b	<0,001**	0,548**
Avaliação Sensorial (n=3x7/dia)		Dias de Armazenamento						<i>p</i>	
		0	1	2	3	4	7		
Alteração da Cor	Exterior	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,4 ^b	0,5 \pm 0,6 ^b	1,1 \pm 0,7 ^c	<0,001***	
	Interior	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,5 \pm 0,5 ^b	<0,001***	
Aspetto exterior	Perda de Brilho	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,4 ^a	0,5 \pm 0,5 ^b	<0,001***	
Cheiro	Pútrido	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,4 \pm 0,7 ^b	0,6 \pm 0,9 ^b	<0,001***	
Textura	Fibrosa	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,3 \pm 0,5 ^b	0,9 \pm 0,6 ^c	<0,001***	
Sabor	Ácido	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,3 \pm 0,5 ^b	0,4 \pm 0,7 ^b	<0,001***	
	Pútrido	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,5 ^{a,b}	0,4 \pm 0,7 ^b	<0,001***	

Letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias (avaliação instrumental) e medianas (avaliação sensorial).

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

*** Valores de p de análises Kruskal-Wallis. As medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney U, quando a normalidade não foi confirmada pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

Além do atum, também foi avaliada a cor dos vegetais presentes neste produto, milho e feijão vermelho (Tabela 7.8). Apenas foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) no milho, mais propriamente na coordenada b^* e no ΔE . Tendo em consideração a escala de cores para o parâmetro b^* , verifica-se que, com o passar dos dias no frigorífico, o milho tende a escurecer, passando da cor amarela característica para um tom ligeiramente acinzentado. É possível ver que existe uma correlação negativa muito forte e altamente significativa entre os valores registados e o tempo de armazenamento. Ocorreu também uma variação total da cor, ΔE , após 1 dia de armazenamento, considerada como muito distinta, e posterior aumento até ao último dia de análise.

Estas alterações da cor também foram identificadas sensorialmente, tanto na parte exterior e interior do atum (Tabela 7.7) como para o milho (Tabela 7.8). A diminuição da luminosidade determinada instrumentalmente na parte exterior do atum foi também caracterizada pelos provadores mas neste caso apenas passados 4 dias. Desta forma, verifica-se que os valores obtidos instrumentalmente confirmam as alterações sensoriais de forma mais precoce, só sendo detetadas pelo painel sensorial mais tardiamente. Os parâmetros sensoriais tabelados correspondem aos que foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) ao longo do período de armazenamento.

A par da cor e brilho, os atributos sensoriais a nível do aspeto, cheiro, textura e sabor avaliados também demonstraram que, ao quarto dia, as amostras apresentaram algum grau de deterioração, nomeadamente aspeto e textura mais seca/fibrosa, ligeiro cheiro a pútrido, e um sabor mais ácido e pútrido. Ao contrário das duas amostras de atum discutidas anteriormente (AN e AO), a amostra de AV foi a que sensorialmente se manteve com qualidade durante mais tempo, neste caso durante 3 dias no frigorífico. Esta conserva, além do atum, milho e feijão vermelho também tem na sua composição pimento vermelho, cebola aos cubos, bem como um molho denso, presente em pequena quantidade, e composto por óleo de girassol, vinagre de estragão, sal, especiarias, goma de guar (E412) e goma de alfarroba (E410) (Ramirez, 2014). Estes ingredientes podem conferir um sabor mais intenso, característico deste tipo de conserva, que possivelmente poderão “mascarar” até certo ponto a deterioração do produto, daí que pela avaliação sensorial os atributos relacionados com a alteração da sua qualidade sejam sentidos numa fase mais tardia. É importante referir que as variações observadas não foram, por sua vez, identificadas pelos provadores de forma uniforme, o que aumentou a dispersão dos resultados e diminuiu a significância das diferenças estatísticas.

Tabela 7.8 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial dos vegetais das amostras de atum com milho e feijão vermelho (AV), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Avaliação Instrumental (n=3/dia)		Dias de Armazenamento						<i>p</i>	<i>r</i>
		0	1	2	3	4	7		
Milho	L^*	62,1 \pm 3,3	58,1 \pm 1,1	58,1 \pm 2,1	58,5 \pm 0,2	58,7 \pm 1,6	57,9 \pm 0,9	0,104	-
	a^*	5,7 \pm 0,8	5,6 \pm 0,2	5,0 \pm 0,8	4,9 \pm 0,2	5,0 \pm 0,5	5,3 \pm 0,5	0,368	-
	b^*	48,3 \pm 1,7 ^a	45,3 \pm 1,2 ^b	44,9 \pm 1,9 ^b	42,0 \pm 1,67 ^c	41,0 \pm 1,3 ^c	39,9 \pm 0,5 ^c	<0,001*	-0,856**
	ΔE	0,0 \pm 0,0 ^a	5,6 \pm 3,0 ^{a,b}	5,9 \pm 3,0 ^{a,b}	8,0 \pm 1,3 ^b	8,4 \pm 1,9 ^{a,b}	9,9 \pm 2,2 ^{a,b}	0,002**	0,752**
Feijão vermelho	L^*	24,4 \pm 0,6	24,2 \pm 0,5	24,0 \pm 1,4	23,6 \pm 0,7	24,0 \pm 1,0	24,0 \pm 1,7	0,955	-
	a^*	17,3 \pm 2,4	18,5 \pm 1,7	17,7 \pm 0,5	17,4 \pm 0,6	17,3 \pm 2,2	17,7 \pm 0,7	0,930	-
	b^*	8,6 \pm 1,6	7,9 \pm 1,0	7,7 \pm 0,7	8,0 \pm 0,8	8,3 \pm 0,8	7,9 \pm 0,6	0,873	-
	ΔE	0,0 \pm 0,0	2,8 \pm 2,3	2,9 \pm 1,7	2,7 \pm 1,2	1,4 \pm 0,2	2,3 \pm 1,2	0,150	-
Avaliação Sensorial (n=3x7/dia)		Dias de Armazenamento						<i>p</i>	
		0	1	2	3	4	7		
Alteração da Cor	Milho (Escurecimento)	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,4 ^b	0,1 \pm 0,4 ^b	0,029***	
Textura	Feijão vermelho (Seca)	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,4 ^b	0,001***	

Letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias (avaliação instrumental) e medianas (avaliação sensorial).

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

*** Valores de p de análises Kruskal-Wallis. As medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney U, quando a normalidade não foi confirmada pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

Análise Química

Pela análise dos parâmetros químicos, descritos na Tabela 7.9, é possível verificar que o teor de humidade se manteve constante ao longo do período de armazenamento considerado, não apresentando diferenças significativas entre os valores registados nesse mesmo período de tempo ($p>0,05$).

Relativamente aos valores de pH obtidos, com diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$), é observada uma oscilação ao longo dos dias e não um comportamento gradual, sendo o valor registado no último dia igual ao valor determinado no primeiro dia, respetivo à abertura da lata. Tal como já foi mencionado, os diferentes ingredientes, além do atum, característicos deste tipo de conservas estão presentes em proporção variável, pelo que podem ocorrer ligeiras variações nos valores de pH por exemplo. A avaliação sensorial do atum (Tabela 7.7) demonstrou que após 4 dias de conservação no frigorífico alguns provadores caracterizaram o sabor como mais ácido, mas que pela medição do pH não se verificou uma diminuição do seu valor que se correlacionasse com a análise sensorial. Mais uma vez teria sido interessante complementar com a avaliação da acidez livre.

Para os parâmetros indicadores de deterioração proteica, ABVT e aminas biogénicas (Tabela 7.9), o teor em ABVT, relativo às aminas voláteis, foi o único que apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$). Na verdade, verificou-se um aumento gradual até ao último dia de análise, com uma correlação fortemente positiva (0,675) e altamente significativa ($p<0,01$). Contudo, os valores obtidos encontram-se bastante abaixo do limite de ABVT em conservas de peixe (40-45mg N/100g de peixe), e até mesmo abaixo do limite para o qual o peixe fresco é considerado como satisfatório (25-30mg N/100g de peixe) (Aubourg, 2001). Além disso, é possível constatar que, em comparação com os teores de ABVT para as amostras de AN (Tabela 7.3) e de AO (Tabela 7.6), os teores registados nas amostras de AV são mais baixos (Tabela 7.9). Este teor mais baixo também será certamente devido ao facto do atum estar diluído nos vegetais uma vez que a análise química foi realizada na amostra total, após homogeneização. De acordo com o fabricante, os vegetais encontram-se numa proporção variável.

Pela análise individual das aminas biogénicas presentes nesta amostra (Tabela 7.9) verifica-se que a putrescina é a que se encontra em maior concentração, seguida da espermina, espermidina e histamina. Contudo, não são observadas diferenças significativas na putrescina ($p>0,05$) ao longo do período de armazenamento, apesar de

Tabela 7.9 Resultados obtidos nos parâmetros químicos avaliados para as amostras de atum com milho e feijão vermelho (AV), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Parâmetros Avaliados (n=3/dia)	Dias de Armazenamento						<i>p</i>	<i>r</i>
	0	1	2	3	4	7		
Humidade (%)	70,5 \pm 1,1	70,4 \pm 0,2	70,4 \pm 0,3	70,2 \pm 0,9	70,2 \pm 0,9	70,5 \pm 0,3	0,990	-
pH	5,41 \pm 0,08 ^a	5,50 \pm 0,08 ^b	5,59 \pm 0,08 ^c	5,42 \pm 0,03 ^{a,b}	5,50 \pm 0,07 ^b	5,41 \pm 0,06 ^a	<0,001*	-0,171
ABVT(mg N/100g amostra)	16,1 \pm 0,3 ^a	15,5 \pm 0,9 ^{a,b}	16,7 \pm 0,1 ^{a,b}	17,8 \pm 0,5 ^{a,b}	17,5 \pm 0,3 ^b	17,5 \pm 0,2 ^b	0,006**	0,675**
Aminas biogénicas (mg/kg amostra)								
Putrescina	10,5 \pm 0,4	12,5 \pm 1,4	13,4 \pm 1,6	13,5 \pm 2,1	13,4 \pm 1,3	12,5 \pm 0,9	0,133	-
Histamina	0,3 \pm 0,1 ^a	0,5 \pm 0,1 ^b	0,5 \pm 0,1 ^b	0,5 \pm 0,0 ^b	0,5 \pm 0,0 ^b	0,4 \pm 0,1 ^b	0,005*	0,224
Espermidina	6,8 \pm 0,3 ^a	7,7 \pm 0,7 ^{a,b}	8,3 \pm 0,5 ^{b,c}	8,3 \pm 0,8 ^{b,c}	8,6 \pm 0,6 ^{b,c}	9,2 \pm 1,0 ^c	0,020*	0,740**
Espermina	8,9 \pm 0,5 ^a	10,0 \pm 0,9 ^{a,b}	11,7 \pm 0,1 ^b	10,7 \pm 1,2 ^{a,b}	11,8 \pm 1,0 ^b	14,2 \pm 2,0 ^c	0,001*	0,838**
Aminas Total	26,5 \pm 1,1 ^a	30,7 \pm 2,1 ^{a,b}	33,8 \pm 2,2 ^{b,c}	33,1 \pm 3,6 ^{b,c}	34,2 \pm 2,2 ^{b,c}	36,4 \pm 3,5 ^c	0,008*	0,728**
Índice de aminas biogénicas[#]	10,7 \pm 0,4	13,0 \pm 1,3	13,9 \pm 1,6	14,1 \pm 2,1	13,9 \pm 1,3	12,9 \pm 1,0	0,096	-
Gordura (g/100g amostra)	4,12 \pm 0,74	4,35 \pm 1,28	4,13 \pm 1,38	4,94 \pm 1,66	4,40 \pm 1,60	4,56 \pm 0,47	0,967	-
dos quais LC-PUFAs (g/100g amostra)	0,12 \pm 0,04	0,12 \pm 0,03	0,10 \pm 0,03	0,15 \pm 0,02	0,11 \pm 0,07	0,13 \pm 0,02	0,636	-
TBARS (mg MDA/kg amostra)	0,77 \pm 0,07	0,63 \pm 0,04	1,20 \pm 0,25	0,96 \pm 0,17	0,97 \pm 0,35	0,96 \pm 0,22	0,080	-
Vitamina E (mg/100g amostra)	3,25 \pm 0,15 ^{a,c}	3,24 \pm 0,54 ^{a,c}	2,35 \pm 0,48 ^b	2,72 \pm 0,60 ^{a,b}	3,67 \pm 0,39 ^c	3,74 \pm 0,24 ^c	0,013*	0,391
Fenólicos Totais (mg AG/100g amostra)	79,4 \pm 1,2 ^{a,b}	80,5 \pm 2,2 ^{a,b}	81,4 \pm 1,0 ^b	79,9 \pm 1,1 ^{a,b}	80,0 \pm 3,5 ^{a,b}	75,7 \pm 0,8 ^a	0,010**	-0,564*

Diferentes letras na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias.

* Valores de *p* de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de *p* de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como *r*) é significativa para um nível de 0,01 (***p*) ou nível de 0,05 (**p*).

[#] Corresponde á soma de Putrescina + Cadaverina + Histamina + Tiramina

apresentar um ligeiro acréscimo passado 24 horas, sem significado estatístico ($p>0,05$). A histamina apresentou diferenças significativas ($p<0,05$) logo no primeiro dia, com um aumento constante ao longo do tempo, e apresentando uma correlação positiva forte. A histamina apresenta níveis mais baixos do que as conservas de AN e AO anteriores, provavelmente devido à menor quantidade de peixe por 100g de amostra, conforme referido para o ABVT. A espermidina e espermina mostraram-se significativamente aumentadas ao segundo dia, com uma correlação muito fortemente positiva e altamente significativa. De salientar que, apesar dos teores de espermina serem semelhantes ao apresentado no atum em óleo, o teor em espermidina foi muito superior ao apresentado pelas conservas de AN e AO, praticamente no triplo. Perante o estudo desenvolvido por Binh *et al.* (2011), que teve como finalidade a presença de poliaminas na dieta mediterrânea, constata-se que a espermidina é a que está presente em maior concentração nos vegetais, seguida da putrescina e espermina, como descrito também por Ali *et al.* (2011), podendo assim contribuir para o aumento destas duas aminas (espermidina e putrescina). Adicionalmente, Kalač e Krausová (2005) descreveram que em alimentos de origem vegetal são identificados maiores teores de espermidina relativamente à espermina, enquanto que em alimentos de origem animal se verifica uma relação oposta, em acordo com o obtido neste estudo, com valores de espermina claramente superiores nas amostras de AN e AO e mais reduzidos no atum com vegetais.

O índice de aminas biogénicas avaliado não demonstrou diferenças significativas ($p>0,05$) no período de tempo considerado (Tabela 7.9). Apesar de serem observadas pequenas variações, verifica-se que após 7 dias de armazenamento o valor é apenas ligeiramente superior ao do primeiro dia de análise (12,9 vs 10,7). Os valores obtidos encontram-se largamente abaixo do valor limite de qualidade aceitável para amostras de peixe ($<50\text{mg/kg}$) (Prester, 2011), enquanto que comparativamente com as amostras de AN e AO são mais elevados, devido a um aumento na concentração da putrescina.

Ao nível da fração lipídica não foi observada a deterioração do produto (Tabela 7.9). Pela análise da % de gordura é notório que o seu valor é superior nas amostras de AV do que nas de AN pois, mesmo em pequenas quantidades, o molho contém uma certa % de óleo vegetal, mas é inferior ao apresentado pelas amostras de AO, na medida em que o molho utilizado para estas conservas é exclusivamente composto por óleo vegetal, além de estar presente em maiores quantidades. Mesmo após abertura, sujeita a condições de conservação diferentes, as conservas de AV mantiveram o seu teor em PUFA de cadeia longa. Desta forma, é possível verificar que os ingredientes adicionados ao atum, nomeadamente do molho e pimento vermelho, “protegeram” a

fração lipídica do atum. Contudo, o teor de LC-PUFAs por 100g de amostra foi inferior ao observado nas amostras de AN e AO. Em relação ao AN a redução é proporcional ao teor de peixe por 100g de amostra, mais reduzido na amostra de atum com milho e feijão vermelho. Contudo, não se atingem os valores apresentados pelo atum em óleo, reforçando que, também na conserva AV poderá ocorrer perda por lixiviação de parte dos LC-PUFAs para o molho.

A determinação de TBARS demonstrou que no período de armazenamento ocorreu um ligeiro aumento no seu valor, mas sem significado estatístico ($p>0,05$), sendo registado um valor ligeiramente mais alto no último dia (0,96mg MDA/kg amostra), em comparação com o primeiro (0,77mg MDA/kg amostra) (Tabela 7.9).

A vitamina E, composta maioritariamente por α -tocoferol (>85%) (não apresentados), não apresentou alterações, apesar de terem sido identificadas diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$), como pode comprovado pela avaliação da Tabela 7.9. O teor de vitamina E total é claramente superior ao apresentado no NA, indicativo da sua origem no molho, e proporcional ao teor em gordura incorporado na amostra. No terceiro dia observou-se um valor ligeiramente inferior, provavelmente correlacionado com o teor de TBARS aumentado nessa mesma amostragem.

Ao contrário das amostras de conservas de atum até então referidas, AN e AO, para as conservas de AV considerou-se importante, sob o ponto de vista nutricional, a avaliação do teor dos compostos fenólicos, devido à presença de vegetais. Os antioxidantes presentes em diversos alimentos são responsáveis pela proteção do organismo face à ação dos radicais livres, nomeadamente as espécies reativas ao oxigénio (Turkmen *et al.*, 2005) um tema atualmente muito relevante. É importante salientar que se teve como referência estudos debruçados na avaliação da capacidade antioxidante de vegetais enlatados, apesar de no presente trabalho este tipo de produto conter, além de diversos vegetais, atum.

No momento da abertura registou-se um teor em compostos fenólicos totais de 79 mg equivalentes de ácido gálico (AG) por 100g de amostra (Tabela 7.9). Pela análise dos resultados no período de armazenamento considerado são verificadas diferenças significativas ($p<0,05$) pontualmente em alguns dias mas no global apresentaram-se bastante estáveis, sem diferenças significativas entre o primeiro e ultimo dia de amostragem. Perante a análise de valores tabelados para frutos e vegetais enlatados no estudo desenvolvido por Rickman *et al.* (2007) com 68mg AG/100g de milho enlatado ou os 20-30mg AG/100g descritos por Luthria e Pastor-Corrales (2006) para algumas

variedades de feijão vermelho enlatado, verifica-se que a concentração em compostos fenólicos é diferente consoante que o tipo de vegetal e condições de processamento. Acresce ainda que os vegetais incluíam também pequenas quantidades de pimento vermelho, com elevado teor em compostos fenólicos (Turkmen *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2010). Assim, tendo em conta a pouca quantidade de vegetais presentes na lata das amostras de AV, os resultados obtidos são muito satisfatórios e com alguma importância do ponto de vista da ingestão de compostos bioactivos para o consumidor.

7.2.4 Atum com salada russa e maionese (AM)

Análise Física e Sensorial

Pela avaliação das coordenadas da cor determinadas instrumentalmente nas conservas de atum com salada russa e maionese (AM), descritas nas Tabelas 7.10 (atum) e 7.11 (vegetais) é possível verificar que, no que respeita à parte exterior e interior do atum, os parâmetros L^* e a^* voltam a ser os que apresentam diferenças significativas no período de tempo considerado ($p < 0,05$), demonstrando também em ambas as partes uma correlação fortemente negativa e altamente significativa entre os valores obtidos. Tanto o L^* como o a^* são acompanhados por uma diminuição no decorrer dos dias de análise, sendo caracterizada por uma perda da luminosidade e de tons vermelhos. No momento da abertura o valor registado para a coordenada de L^* na parte interior é inferior, o que se constata que a luminosidade é menos intensa, com posterior decréscimo, mas menos acentuado do que o verificado na parte exterior. O mesmo acontece para os valores de ΔE , cuja variação da cor após 24 horas é classificada analiticamente como muito distinta (ΔE) nas duas partes do atum avaliadas (Pathare *et al.*, 2013). Em contrapartida, o ΔE exterior vai aumentando gradualmente até aos 7 dias de conservação, em que os valores correlacionam-se como tempo de uma forma fortemente positiva e altamente significativa, enquanto na parte exterior aumenta até ao terceiro dia, mantendo-se posteriormente estável no decorrer dos restantes dias.

Relativamente aos vegetais presentes neste tipo de conserva (Tabela 7.11), a batata e a cenoura demonstraram diferenças significativas ($p < 0,05$) nas coordenadas b^* , e a^* e b^* , respetivamente. A batata perdeu a sua cor inicial (“amarelo pálido”), com redução de b^* , principalmente no primeiro dia, que tendeu para um tom mais acastanhado. Já a cor verde da ervilha foi ficando menos intensa, comprovada pela diminuição no valor de a^* , com uma correlação positiva muito forte e altamente significativa, e um aumento no valor de b^* . Por sua vez, a variação total da cor foi significativa na batata mas não na ervilha. A cenoura, que não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) nas coordenadas separadamente, demonstrou valores de ΔE com

Tabela 7.10 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do atum com salada russa e maionese (AM), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio de 3 amostras \pm desvio padrão)

Avaliação Instrumental (n=3x3/dia)		Dias de Armazenamento						<i>p</i>	<i>r</i>
		0	1	2	3	4	7		
Parte Exterior	L^*	62,5 \pm 1,2 ^a	61,3 \pm 1,5 ^{a,b}	58,1 \pm 2,4 ^{b,c,d}	58,2 \pm 0,8 ^c	56,7 \pm 2,0 ^{c,d}	56,3 \pm 1,0 ^d	<0,001**	-0,741**
	a^*	9,2 \pm 1,2 ^a	6,9 \pm 0,6 ^{b,c,d}	7,3 \pm 0,3 ^c	6,5 \pm 0,3 ^d	6,5 \pm 1,2 ^{c,d,e}	5,5 \pm 0,3 ^e	<0,001**	-0,725**
	b^*	22,5 \pm 1,8 ^a	19,6 \pm 0,9 ^b	21,3 \pm 1,4 ^{a,b}	20,4 \pm 0,7 ^{a,b}	19,8 \pm 2,6 ^{a,b}	21,2 \pm 1,2 ^{a,b}	0,002**	-0,113
	ΔE	0,0 \pm 0,0 ^a	4,8 \pm 1,5 ^b	5,1 \pm 2,0 ^{b,c,d}	6,3 \pm 0,3 ^{b,c}	8,1 \pm 2,2 ^{c,d}	7,8 \pm 1,1 ^d	<0,001**	0,733**
Parte Interior	L^*	58,8 \pm 2,9 ^{a,b,c,d}	59,7 \pm 0,8 ^a	57,3 \pm 1,0 ^b	54,4 \pm 1,7 ^{c,d}	55,2 \pm 0,9 ^d	54,7 \pm 1,9 ^{b,c,d}	<0,001**	-0,629**
	a^*	9,6 \pm 1,1 ^a	7,2 \pm 0,8 ^{b,c}	7,7 \pm 0,6 ^c	6,7 \pm 0,5 ^b	6,5 \pm 0,4 ^b	5,7 \pm 0,3 ^d	<0,001**	-0,768**
	b^*	21,4 \pm 1,9	20,5 \pm 1,1	20,8 \pm 1,5	20,0 \pm 0,5	20,6 \pm 1,4	20,5 \pm 0,9	0,326	-
	ΔE	0,0 \pm 0,0 ^a	3,8 \pm 1,8 ^b	4,6 \pm 2,0 ^b	6,2 \pm 1,8 ^b	5,9 \pm 1,4 ^b	5,5 \pm 0,3 ^b	<0,001**	0,333*
Avaliação Sensorial (n=3x7/dia)		Dias de Armazenamento						<i>p</i>	
		0	1	2	3	4	7		
Alteração da Cor	Exterior	0,0 \pm 0,0 ^a	1,0 \pm 0,7 ^b	1,2 \pm 0,8 ^b	1,8 \pm 0,8 ^c	-	-	<0,001***	
	Interior	0,0 \pm 0,0 ^a	0,4 \pm 0,5 ^b	1,1 \pm 0,7 ^c	2,0 \pm 0,6 ^d	-	-	<0,001***	
Aspetto exterior	Húmido	0,0 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,4 ^{a,b}	0,5 \pm 0,8 ^{b,c}	0,8 \pm 1,0 ^c	-	-	0,001***	
Cheiro	Fermentação	0,0 \pm 0,0 ^a	0,3 \pm 0,5 ^b	1,3 \pm 0,6 ^c	1,6 \pm 0,8 ^c	-	-	<0,001***	
Textura	Mole	0,0 \pm 0,0 ^a	0,5 \pm 0,5 ^b	0,8 \pm 0,8 ^{b,c}	1,2 \pm 0,9 ^c	-	-	<0,001***	
Sabor	Ácido	0,0 \pm 0,0 ^a	1,2 \pm 0,9 ^b	2,1 \pm 1,0 ^c	2,9 \pm 0,9 ^d	-	-	<0,001***	

Letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias (avaliação instrumental) e medianas (avaliação sensorial).

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

*** Valores de p de análises Kruskal-Wallis. As medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney U, quando a normalidade não foi confirmada pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

Tabela 7.11 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial dos vegetais das amostras de atum com salada russa e maionese (AM), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Avaliação Instrumental (n=3/dia)		Dias de Armazenamento						<i>p</i>	<i>r</i>
		0	1	2	3	4	7		
Batata	L^*	70,2 \pm 1,0	70,9 \pm 1,3	70,9 \pm 0,7	70,8 \pm 0,5	70,2 \pm 0,4	70,8 \pm 1,2	0,873	-
	a^*	-1,4 \pm 0,2	-1,5 \pm 0,3	-1,5 \pm 0,1	-1,5 \pm 0,1	-1,5 \pm 0,1	-1,5 \pm 0,0	0,977	-
	b^*	18,8 \pm 0,9 ^a	15,3 \pm 0,7 ^b	16,2 \pm 1,4 ^b	15,7 \pm 0,8 ^b	15,2 \pm 1,2 ^b	15,1 \pm 0,5 ^b	0,012*	-0,552*
	ΔE	0,0 \pm 0,0 ^a	3,4 \pm 0,7 ^b	2,5 \pm 0,4 ^b	2,8 \pm 1,6 ^{a,b}	3,0 \pm 1,1 ^{a,b}	3,5 \pm 1,1 ^{a,b}	0,007**	0,522**
Ervilha	L^*	50,8 \pm 1,4	50,9 \pm 0,9	50,2 \pm 1,8	50,3 \pm 0,3	50,3 \pm 1,0	50,5 \pm 1,1	0,955	-
	a^*	-1,6 \pm 0,1 ^a	-1,2 \pm 0,1 ^b	-1,1 \pm 0,1 ^c	-0,8 \pm 0,1 ^d	-0,5 \pm 0,1 ^e	-0,5 \pm 0,1 ^e	<0,001*	0,909**
	b^*	25,5 \pm 2,2 ^a	25,7 \pm 1,4 ^a	28,7 \pm 1,4 ^b	28,8 \pm 1,3 ^b	28,7 \pm 0,7 ^b	29,7 \pm 1,5 ^b	0,018*	0,674**
	ΔE	0,0 \pm 0,0	1,9 \pm 0,9	3,5 \pm 1,0	3,5 \pm 1,8	3,8 \pm 2,0	4,8 \pm 3,0	0,058	-
Cenoura	L^*	53,7 \pm 1,8	51,2 \pm 1,0	51,1 \pm 0,8	51,4 \pm 0,4	51,5 \pm 1,7	50,6 \pm 1,8	0,171	-
	a^*	14,4 \pm 2,2	14,8 \pm 0,9	15,4 \pm 1,3	16,7 \pm 0,6	15,0 \pm 1,1	15,7 \pm 0,5	0,345	-
	b^*	28,5 \pm 1,0	27,4 \pm 1,1	28,5 \pm 1,0	29,3 \pm 2,6	28,8 \pm 2,3	28,3 \pm 1,2	0,822	-
	ΔE	0,0 \pm 0,0 ^a	3,3 \pm 2,3 ^b	3,1 \pm 0,9 ^b	4,6 \pm 1,2 ^b	4,2 \pm 1,1 ^b	4,3 \pm 2,2 ^b	0,025**	0,561**
Avaliação Sensorial (n=3x7/dia)		Dias de Armazenamento						<i>p</i>	
		0	1	2	3	4	7		
Alteração da Cor	Batata e Ervilha (Escurecimento e Descoloração)	0,0 \pm 0,0 ^a	0,4 \pm 0,5 ^b	0,8 \pm 0,9 ^{b,c}	1,1 \pm 1,0 ^c	-	-	<0,001***	
Textura	Batata e Cenoura (Mole)	0,0 \pm 0,0 ^a	0,4 \pm 0,5 ^b	0,8 \pm 0,8 ^{b,c}	1,3 \pm 1,1 ^c	-	-	<0,001***	

Letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias (avaliação instrumental) e medianas (avaliação sensorial).

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

*** Valores de p de análises Kruskal-Wallis. As medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney U, quando a normalidade não foi confirmada pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

diferenças significativas ($p < 0,05$). A variação total da cor foi muito distinta ($\Delta E > 3$) logo após 24 horas para a batata e cenoura e passados 2 dias para a ervilha.

Os atributos sensoriais expostos na Tabela 7.10 e 7.11 foram avaliados apenas até ao terceiro dia de armazenamento, na medida em que, comparativamente às outras amostras de conservas de atum avaliadas neste trabalho, as amostras de AM foram as que demonstraram alterações, mais intensas, associadas a uma deterioração do produto logo após 1 dia no frigorífico nos principais parâmetros sensoriais avaliados. Como tal, não havia necessidade de progredir com a análise sensorial até ao final do período de tempo considerado, pois o objetivo principal deste do presente estudo consistiu em determinar em que momento o produto já não apresentava a qualidade pretendida, claramente ultrapassado no terceiro dia.

É possível correlacionar os resultados obtidos instrumentalmente na avaliação da cor com os registados sensorialmente (Tabela 7.10 e 7.11). Tanto na parte exterior como na parte interior os provadores detetaram uma alteração da cor, isto é, uma descoloração, também por eles considerada mais intensa na parte exterior logo após 24 horas. Além disso, na batata e ervilha a alteração da cor foi identificada como um escurecimento e descoloração, respetivamente. Dos vegetais presentes nesta conserva, as ervilhas foram as que permanecem mais íntegras, porque tanto a batata como a cenoura se apresentam na forma de cubos e sem casca, naturalmente mais sujeitos a reações de deterioração. A par destas alterações, o aspeto, cheiro, textura e sabor foram associados a uma perda de qualidade muito precoce pelo produto, tal como: aspeto exterior do atum mais húmido, cheiro a fermentação, textura do atum, batata e cenoura mais mole, e sabor mais ácido, todos eles com significado estatístico ($p < 0,05$). Ainda na Tabela 7.10 considerou-se importante fazer referência aos resultados obtidos na avaliação sensorial da maionese. Não foi possível realizar a avaliação instrumental da cor da maionese para as amostras de AM devido à pouca quantidade presente na lata, estando esta “aderente” ao atum e vegetais. Não foram verificadas alterações na cor pela análise sensorial mas é de valorizar as alterações observadas pelos provadores a nível do aspeto. Consideraram que a maionese ficou mais líquida passado 24 horas, intensificando-se esta alteração no dia 3 (último dia da análise sensorial). As diferenças identificadas neste atributo sensorial demonstraram significado estatístico ($p < 0,05$). Contudo, o sabor ácido foi o mais crucial na definição do momento de rejeição, apresentando uma menor dispersão dos resultados, o que leva a concluir que foi o atributo maioritariamente identificado pelos provadores.

Tabela 7.12 Resultados obtidos nos parâmetros químicos avaliados para as amostras de atum com salada russa e maionese (AM), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Parâmetros Avaliados (n=3/dia)	Dias de Armazenamento						p	r
	0	1	2	3	4	7		
Humidade (%)	74,2 \pm 0,7	73,8 \pm 1,02	74,3 \pm 0,4	74,0 \pm 0,7	74,0 \pm 0,4	73,6 \pm 1,0	0,870	-
pH	5,23 \pm 0,05 ^a	5,23 \pm 0,03 ^a	5,17 \pm 0,03 ^b	5,15 \pm 0,04 ^b	5,23 \pm 0,03 ^a	4,89 \pm 0,04 ^c	<0,001*	-0,810**
ABVT(mg N/100g amostra)	17,3 \pm 0,3 ^a	17,9 \pm 0,1 ^b	19,5 \pm 0,2 ^c	19,5 \pm 0,1 ^c	19,9 \pm 0,4 ^c	19,4 \pm 0,3 ^c	<0,001*	0,683**
Aminas biogénicas (mg/kg amostra)								
Putrescina	3,9 \pm 0,5 ^a	7,4 \pm 1,4 ^b	7,8 \pm 1,1 ^b	7,6 \pm 0,7 ^b	8,6 \pm 1,8 ^b	7,0 \pm 0,9 ^b	0,005*	0,408
Histamina	0,2 \pm 0,0 ^a	0,6 \pm 0,0 ^b	0,7 \pm 0,1 ^b	0,6 \pm 0,1 ^b	0,8 \pm 0,2 ^b	0,6 \pm 0,1 ^b	0,001*	0,445
Espermidina	5,0 \pm 0,9 ^a	6,3 \pm 0,9 ^{a,b}	6,6 \pm 0,9 ^{a,b}	7,4 \pm 0,3 ^{b,c}	7,2 \pm 1,2 ^{b,c}	8,5 \pm 0,9 ^c	0,009*	0,784**
Espermina	6,4 \pm 0,9 ^{a,b}	6,6 \pm 1,1 ^{a,b}	5,9 \pm 0,6 ^a	7,6 \pm 0,7 ^b	7,2 \pm 0,7 ^{a,b}	11,7 \pm 0,3 ^c	<0,001*	0,850**
Aminas Total	15,4 \pm 1,1 ^a	20,9 \pm 2,1 ^b	20,9 \pm 2,4 ^b	23,1 \pm 0,6 ^b	23,8 \pm 3,3 ^b	27,8 \pm 1,7 ^c	<0,001*	0,861**
Índice de aminas biogénicas[#]	4,00 \pm 0,45 ^a	8,00 \pm 1,43 ^b	8,35 \pm 1,03 ^b	8,15 \pm 0,64 ^b	9,36 \pm 1,62 ^b	7,62 \pm 0,85 ^b	0,001*	0,427
Gordura (g/100g amostra)	4,38 \pm 0,10	4,71 \pm 0,07	4,09 \pm 0,92	4,51 \pm 0,67	4,09 \pm 0,82	4,95 \pm 0,52	0,491	-
dos quais LC-PUFAs (g/100g amostra)	0,11 \pm 0,02 ^{a,b}	0,19 \pm 0,03 ^{a,b}	0,14 \pm 0,04 ^{a,b}	0,17 \pm 0,01 ^b	0,18 \pm 0,07 ^{a,b}	0,10 \pm 0,01 ^a	0,004**	-0,214
TBARS (mg MDA/kg amostra)	0,65 \pm 0,04 ^a	0,74 \pm 0,08 ^{a,b}	0,74 \pm 0,07 ^{a,b}	0,96 \pm 0,13 ^{b,c}	1,08 \pm 0,28 ^c	0,93 \pm 0,15 ^{b,c}	0,024*	0,571*
Vitamina E (mg/100g amostra)	4,43 \pm 0,20	4,27 \pm 0,09	4,09 \pm 0,30	4,22 \pm 0,51	4,12 \pm 0,12	4,56 \pm 0,52	0,528	-
Fenólicos Totais (mg AG/100g amostra)	66,2 \pm 0,9 ^a	64,5 \pm 0,5 ^a	64,0 \pm 2,2 ^a	59,4 \pm 2,5 ^b	56,4 \pm 2,3 ^b	57,3 \pm 1,2 ^b	<0,001*	-0,814**

Diferentes letras na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias.

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

[#] Corresponde á soma de Putrescina + Cadaverina + Histamina + Tiramina

Análise Química

Pela avaliação dos resultados obtidos para o parâmetro da humidade, verifica-se que estes não apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) (Table 7.12) no decorrer do tempo de conservação no frigorífico, pelo que as condições a que o produto foi exposto após abertura da conserva não incrementou nenhuma alteração no teor de humidade. Na verdade, tanto nas amostras de AV como nas de AM, em que não foi possível escorrer o molho da lata, devido a estar presente em pouca quantidade quando comparado com o molho das conservas de AN e AO, os valores da % de humidade foram bastante estáveis.

Já no que respeita ao comportamento do pH é possível observar uma diminuição significativa após 2 dias de armazenamento, seguido posteriormente por um ligeiro aumento ao quarto dia, voltando a diminuir passado 7 dias, registando-se um valor neste último dia de $4,89\pm0,04$, inferior ao do momento de abertura ($5,23\pm0,05$) (Tabela 7.12). Não sendo uma redução significativa é o valor mais baixo registado em todas as amostras de atum e o único abaixo de pH 5. Sensorialmente os provadores consideraram que o sabor do produto já estava mais ácido logo após 24 horas, mas pela medição do pH a primeira diminuição identificada, e estatisticamente significativa ($p<0,05$), foi passado 2 dias. Assim, os provadores demonstraram maior sensibilidade a esta mudança nas características do produto, relativamente ao pH. Teria sido interessante analisar o valor da acidez livre, pois está mais correlacionada com as perceções sensoriais da acidez.

Debruçando agora a atenção para os parâmetros químicos destinados à avaliação da deterioração a nível da fração proteica, constata-se que tanto para o ABVT como as aminas biogénicas demonstraram diferenças significativas ($p<0,05$) ao longo dos diferentes dias (Tabela 7.12). O teor em ABVT apresentou um aumento gradual ao longo do período de armazenamento considerado, correlacionando-se os valores com o tempo de uma forma fortemente positiva e altamente significativa. Tal como nas amostras de AV, os níveis de ABVT em AM estiveram bastante abaixo do limite de ABVT em conservas de peixe (40-45mg N/100g de peixe), e até mesmo abaixo do limite para o qual o peixe fresco é considerado como satisfatório (25-30mg N/100g de peixe) (Aubourg, 2001). É de referir contudo que, em comparação com os teores de ABVT para as amostras de AV (Tabela 7.9), os registados nas amostras de AM sejam ligeiramente mais altos.

É possível observar que entre as aminas biogénicas quantificadas, a histamina foi a que apresentou concentrações mais baixas no período de armazenamento considerado, conforme verificado e discutido nas amostras anteriores (Tabela 7.12). As restantes aminas, putrescina, espermidina e espermina, demonstraram ter concentrações próximas e claramente superiores às da histamina. Para todas as aminas foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$), tendo a putrescina e histamina mantido concentrações praticamente constantes após o aumento verificado logo às 24 horas. Já na espermidina e espermina os valores registados demonstraram um aumento na sua concentração ao longo dos dias acompanhado por ligeiras oscilações. Estas foram as aminas que tiveram uma correlação forte e muito fortemente positiva, respetivamente, e altamente significativa com o tempo de estudo. Pela observação dos valores obtidos para a concentração total das aminas presentes constata-se que ocorre claramente um aumento de dia para dia até ao momento final de análise, registando-se no primeiro dia um valor de 15,4mg/kg e no último dia de 27,8mg/kg. Verificou-se, desta forma, uma correlação muito fortemente positiva e altamente significativa. É de realçar que a presença dos vegetais induz o aumento da concentração de algumas aminas, nomeadamente a putrescina e espermidina.

Tal como já foi explicado para as amostras de AV, em alimentos de origem vegetal são identificados maiores teores de espermidina relativamente à espermina, enquanto que nos alimentos de origem animal se verifica uma relação oposta. Para estes vegetais em concreto, e pela análise de valores tabelados em diferentes artigos, constata-se que a ervilha apresenta teores elevados de putrescina, espermina e espermidina, seguida da batata e por último a cenoura (Kalač e Krausová, 2005; Ali *et al.*, 2011).

O índice de aminas biogénicas apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) logo após 24 horas, de 4,0 para 8,0, mantendo-se constante até ao final do período de armazenamento. É notório que ambos os parâmetros, ABVT e índice de aminas biogénicas, alteraram significativamente em apenas 1 dia, como comprovado pela análise sensorial, em que, por exemplo, foi identificado um cheiro a fermentação e um sabor mais ácido no mesmo período de tempo. Mesmo assim, os valores obtidos encontram-se abaixo do valor limite do índice de aminas biogénicas para amostras de peixe para o qual a qualidade do produto é aceitável ($< 50\text{mg/kg}$) (Prester, 2011). Comparando os resultados do índice de aminas biogénicas obtidos para as amostras de AM com os de AV vê-se que são inferiores. Apesar de nas amostras de AM também estarem presentes vegetais, o valor de putrescina não foi o mais elevado, pois os vegetais que a compõem não são os mesmos e a concentração nas aminas pode variar. Por exemplo, pela análise de valores tabelados em diferentes artigos constata-se que a

ervilha é a que demonstra maiores teores em putrescina, espermina e espermidina, seguida da batata e por último a cenoura. Além disso, é importante referir que o processamento na transformação em conserva, no caso da batata e ervilha, incrementa um aumento na concentração destas aminas, apesar de na ervilha o processo de enlatamento provocar uma diminuição da putrescina (Kalač e Krausová, 2005; Ali *et al.*, 2011).

Pela avaliação dos parâmetros químicos relativos à deterioração lipídica (Tabela 7.12), verifica-se que o teor em gordura se manteve estável no decorrer dos dias de armazenamento. Estes valores foram semelhantes aos das amostras de AV (Tabela 7.10). De referir alguma oscilação da % de gordura ao longo dos dias, provavelmente devido a uma maior ou menor quantidade de molho no atum, mas sem significado estatístico ($p>0,05$). É importante fazer referência ao facto do molho desta amostra consistir numa maionese sem ovo, feita especialmente para este tipo de produto. A abertura da lata e o armazenamento do seu conteúdo a 4°C numa embalagem de plástico apropriada não induziu a alterações nos teores de gordura, nomeadamente na concentração de PUFA's de cadeia longa. Contudo, estes PUFA's representam apenas, e em média, 3% dos PUFA's totais, num total de cerca de 55% nos lípidos totais, mais uma vez suportados pelo elevado teor em ácido linoleico (50%), neste caso da maionese.

Na quantificação do teor de TBARS, os resultados obtidos demonstraram um aumento passado 24 horas, seguido de uma estabilização até ao segundo dia (Tabela 7.12). De seguida, volta a ocorrer um ligeiro aumento após 3 dias mantendo-se praticamente constante até ao final do período de armazenamento considerado, sendo o valor determinado no último dia de 0,93mg MDA/kg de amostra, superior ao registado no momento de abertura (0,65mg MDA/kg de amostra). Na verdade, este indicador de oxidação lipídica foi acompanhado por diferenças significativas ($p<0,05$), em que os valores correlacionaram-se com o tempo de armazenamento de uma forma razoavelmente positiva (0,571) e significativa ($p<0,05$). Assim, verifica-se que apesar da elevada degradação da amostra esta não é suportada por uma degradação da componente lipídica.

Também a vitamina E (Tabela 7.12) se manteve constante ao longo do período de armazenamento, apresentando um valor ligeiramente mais alto passado 7 dias, que está concordante com o valor também mais alto de gordura registado no mesmo momento de análise. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) neste parâmetro químico. De referir, contudo, que neste caso apenas se verificou a presença

de α -tocoferol (não apresentado), indicativo que o óleo vegetal utilizado no fabrico da maionese é distinto do utilizado no atum em óleo.

As amostras de AM também apresentam vegetais na sua constituição, pelo que também foi determinado o teor em compostos fenólicos totais. No decorrer dos 7 dias no frigorífico foi observada uma diminuição no seu valor (Tabela 7.12), sendo demonstradas diferenças significativas nesse mesmo período de tempo ($p < 0,05$). No primeiro dia de análise o valor foi de 66,2mg AG/100g de amostra, e no último dia foi registado um valor de 57,3mg AG/100g de amostra. É notório que as características desta conserva não permitiram manter nível de compostos fenólicos identificados no momento da abertura. Como já foi referido, o teor em compostos fenólicos difere de vegetal para vegetal e se o produto é fresco ou processado (Rickman *et al.*, 2007). No caso desta conserva estamos na presença de batata, cenoura e ervilha processadas termicamente. Além disso, os valores foram inferiores nas conservas de AM em comparação com as amostras de AV, pois de acordo com Song *et al.* (2010) a cenoura, ervilha e batata apresentam uma menor capacidade antioxidante do que o milho ou o pimento vermelho, por exemplo, presente na conserva de AV. Adicionalmente, Rickman *et al.* (2007) relataram que vegetais frescos como a cenoura, ervilha e batata demonstram uma concentração em compostos fenólicos de 110-130, 80-120 e 50-60mg AG/100g de produto, respetivamente. Mesmo com estes valores, as amostras de AM são produtos processados termicamente e contêm, além dos vegetais, atum, daí que os valores obtidos no contexto deste trabalho sejam inferiores aos tabelados nos estudos dados como exemplo.

7.2.5 Sardinha ao natural (SN)

Análise Física e Sensorial

Na Tabela 7.13 apresentam-se os resultados relativos à avaliação instrumental da cor das amostras de sardinha ao natural (SN), bem como da avaliação sensorial. No caso da cor instrumental os valores apresentados correspondem à média das medições feitas em 3 latas a cada dia ($n=9 \times 3$ para o peixe; $n=3 \times 1$ para o molho), com separação entre cor exterior e interior no peixe. Sensorialmente também se considerou importante separar os resultados da cor da parte exterior e interior. Neste caso os valores apresentados correspondem à média obtida numa escala estruturada de atributos correspondendo à avaliação de 3 latas por cada um dos 7 avaliadores ($n=21$).

Primeiramente é de ressaltar o facto de a sardinha apresentar naturalmente características muito diferentes do atum pois, ao contrário deste, não se apresenta em

Tabela 7.13 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial das sardinhas ao natural (SN), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Avaliação Instrumental ($n=3 \times 9/\text{dia}$)		Dias de Armazenamento						p	r
		0	1	2	3	4	7		
Exterior	L^*	76,3 \pm 5,1 ^a	72,4 \pm 4,5 ^{a,b}	72,4 \pm 4,3 ^{a,b}	73,4 \pm 2,0 ^a	70,2 \pm 4,4 ^b	69,9 \pm 5,0 ^b	< 0,001**	-0,369**
	a^*	-0,8 \pm 0,6	-0,7 \pm 0,5	-0,8 \pm 0,4	-0,8 \pm 0,5	-0,7 \pm 0,6	-0,7 \pm 0,6	0,946	
	b^*	12,5 \pm 2,9	13,9 \pm 2,7	12,6 \pm 2,1	12,1 \pm 2,9	13,3 \pm 3,0	12,1 \pm 2,9	0,130	
	ΔE	0,0 \pm 0,0 ^a	8,7 \pm 4,7 ^b	7,7 \pm 4,3 ^b	6,9 \pm 3,3 ^b	8,1 \pm 5,0 ^b	8,0 \pm 4,6 ^b	<0,001**	0,335**
Interior	L^*	52,4 \pm 3,9 ^a	46,7 \pm 8,4 ^b	45,8 \pm 6,0 ^b	46,6 \pm 2,1 ^b	45,5 \pm 4,2 ^b	46,6 \pm 4,5 ^b	< 0,001**	-0,325**
	a^*	7,4 \pm 2,6 ^a	6,4 \pm 2,7 ^{a,b,c}	6,6 \pm 2,0 ^{a,b}	6,9 \pm 2,7 ^{a,b}	5,2 \pm 1,8 ^{b,c}	5,0 \pm 1,7 ^c	< 0,001**	-0,314**
	b^*	18,2 \pm 2,0 ^a	16,0 \pm 2,5 ^b	17,3 \pm 2,8 ^{a,b}	16,1 \pm 1,8 ^b	16,0 \pm 1,4 ^b	16,7 \pm 1,8 ^b	< 0,001**	-0,156*
	ΔE	0,0 \pm 0,0 ^a	9,3 \pm 4,7 ^b	8,3 \pm 5,0 ^b	8,1 \pm 2,8 ^b	9,6 \pm 4,3 ^b	9,4 \pm 3,9 ^b	< 0,001**	0,409**
Avaliação Sensorial ($n=3 \times 7/\text{dia}$)		Dias de Armazenamento						p	
		0	1	2	3	4	7		
Alteração da Cor	Exterior	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,2 ^{a,b}	0,2 \pm 0,4 ^{a,b}	0,2 \pm 0,4 ^b	0,016***	
Aspetto Exterior	Perda de Brilho	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,4 ^{a,b}	0,3 \pm 0,6 ^b	0,4 \pm 0,6 ^b	<0,001***	
Cheiro	Fermentação	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,2 ^a	0,9 \pm 0,8 ^b	1,1 \pm 1,2 ^b	0,003***	
	Pútrido	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,3 \pm 0,6 ^b	0,001***	
Textura	Fibrosa	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,4 ^b	0,4 \pm 0,5 ^{b,d}	0,8 \pm 0,5 ^c	1,2 \pm 0,7 ^d	<0,001***	
Sabor	Ácido	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,2 ^{a,b}	0,2 \pm 0,4 ^b	0,9 \pm 0,7 ^c	1,5 \pm 0,8 ^d	0,003***	

Letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias (avaliação instrumental) e medianas (avaliação sensorial).

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

*** Valores de p de análises Kruskal-Wallis. As medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney U, quando a normalidade não foi confirmada pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

posta, mas sim íntegra, com a pele original. Esta premissa vai, inevitavelmente, conferir uma proteção adicional do meio exterior e, conseqüentemente, condicionar a evolução da sua degradação com o tempo de refrigeração, conforme será discutido.

Pela análise instrumental da cor é possível observar que, ao longo do período de armazenamento, se verificaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nas coordenadas L^* no exterior e no interior, e nas coordenadas a^* e b^* na parte interior (Tabela 7.13). Assim, constata-se que no momento da abertura a luminosidade é claramente superior na parte exterior (76,3), típica deste tipo de produto (pele e escamas). Na parte interior o produto apresenta tons mais claros e menor luminosidade (52,2), com uma zona longitudinal mais vermelha no local da espinha. De referir que a medição com o colorímetro foi feita, tanto na parte externa como na parte interna, sempre no mesmo sentido, da “cabeça” para a “cauda” e sem a espinha, com 3 medições em cada sardinha.

Após 24 horas no frigorífico foi observada uma diminuição no L^* nas duas partes, mantendo-se, posteriormente, praticamente constante até ao final de 7 dias de conservação, o que vai de encontro a uma perda de luminosidade (mais baço). Além disso, a cor na parte interior é acompanhada por diminuição nos valores de a^* e b^* , sendo esta mais intensa na coordenada a^* , pela perda de vermelhos e menor em b^* , pela perda de amarelos. No que respeita à variação total da cor (ΔE), verifica-se que logo após 24 horas no frigorífico ocorre uma variação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e segundo Pathare *et al.* (2013) muito distinta ($\Delta E > 3$). No exterior e no interior ΔE apresenta valores muito próximos, apesar de na parte externa ser ligeiramente inferior, na parte exterior os valores correlacionam-se com o tempo de armazenamento de uma forma positiva e altamente significativa e na parte interior de uma forma razoavelmente positiva e altamente significativa.

A análise sensorial apenas identificou alteração da cor na parte exterior e a partir do terceiro dia de armazenamento (Tabela 7.13), que o painel designou de descoloração, mas de uma forma pouco intensa. Já no que respeita à luminosidade, esta já teve resultados concordantes por ambos os métodos de avaliação, na medida em que os avaliadores observaram um aumento na perda de brilho com o decorrer do tempo de conservação. Contudo, apesar desta alteração só ter sido identificada sensorialmente após 3 dias no frigorífico, pode ser relacionada com a diminuição nos valores de L^* na parte exterior da sardinha. Desta forma, é possível constatar que a avaliação sensorial apenas detetou alterações significativas na parte externa da sardinha.

Além da alteração da cor, os atributos sensoriais ao nível do cheiro, textura e sabor das sardinhas avaliados demonstraram que após 2 e 3 dias no frigorífico, respetivamente, as amostras já apresentaram algum nível de deterioração. Foram

associados a uma textura mais seca/fibrosa, ligeiro cheiro a fermentação e pútrido, e um sabor mais ácido (Tabela 7.13), alterações estas estatisticamente significativas ($p<0,05$). É importante reforçar que, tal como anteriormente, na Tabela 7.13 apenas estão mencionados os resultados obtidos para os atributos avaliados sensorialmente em que foram observadas diferenças significativas ($p<0,05$). As variações observadas não foram, contudo, sentidas pelos provadores de forma uniforme, o que aumentou a dispersão dos resultados e diminuiu a significância das diferenças aparentemente observadas.

A par destas alterações sensoriais percebidas, as amostras de SN também foram acompanhadas por alterações no molho (Tabela 7.14). O mesmo ficou mais espesso e turvo passado 3 e 4 dias, respetivamente, sendo estes os dois atributos que os provadores mais correlacionaram com a sua deterioração, apresentando diferenças significativas ($p<0,05$) no decorrer do período de conservação. A par da avaliação sensorial, foi possível detetar alterações pela medição instrumental da cor, em que as diferenças observadas foram estatisticamente significativas ($p<0,05$) apenas para os parâmetros a^* e b^* . No entanto, não foi verificado um comportamento gradual ao longo dos dias, mas sim oscilações nos valores, apresentado a^* valores mais constantes, que se correlacionam com o tempo de uma forma positiva e significativa. A variação (ΔE) da cor também demonstrou diferenças significativas ($p<0,05$), com aumento logo após 24 horas. Posteriormente, os resultados foram um pouco inconstantes, em que ao quarto dia de armazenamento ocorreu um acréscimo no seu valor, comportamento este que pode ser explicado pelo facto de no molho escorrido (salmoura) haver a probabilidade de estarem presentes pequenas partes de pele que se tenham desintegrado da parte exterior da sardinha, provocando uma variação da cor. É de ressaltar que no momento da abertura da lata e ao primeiro e segundo dia de conservação no frigorífico o $\Delta E<1,5$, logo a variação neste período de tempo foi, de acordo com Pathare *et al.* (2013), pouco distinta. Já passado 3 e 4 dias foi considerada distinta ($1,5<\Delta E<3,0$) e após 7 dias voltou novamente a ser classificada como pouco distinta ($\Delta E<1,5$). Por sua vez, o molho não foi posteriormente objeto de análise química separadamente por não ser consumido.

Análise Química

No que respeita aos parâmetros químicos avaliados (Tabela 7.15), e pela avaliação dos valores de humidade obtidos, confirma-se que este parâmetro se manteve estável, com pequenas oscilações ao longo do período de armazenamento a temperaturas de refrigeração, não apresentando diferenças significativas nesse mesmo período de tempo ($p>0,05$). É importante frisar que, tal como nas amostras de conservas de atum, os parâmetros sensoriais relativos ao aspeto e textura fibrosa, mencionados na Tabela 7.13, não estão correlacionados com a % de humidade presente no peixe, na

Tabela 7.14 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do molho das amostras de sardinha ao natural (SN), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Avaliação Instrumental ($n=3/dia$)	Dias de Armazenamento						p	r
	0	1	2	3	4	7		
L^*	37,0 \pm 1,6	36,0 \pm 1,4	36,7 \pm 2,82	36,3 \pm 2,6	35,4 \pm 1,5	35,9 \pm 1,6	0,930	
a^*	-0,9 \pm 0,1 ^a	-0,8 \pm 0,1 ^{a,b}	-0,9 \pm 0,0 ^a	-0,9 \pm 0,0 ^a	-0,9 \pm 0,0 ^a	-0,8 \pm 0,1 ^b	0,021*	0,470*
b^*	4,3 \pm 0,4 ^a	4,4 \pm 0,3 ^{ac}	4,2 \pm 0,1 ^{a,b,c}	4,7 \pm 0,5 ^a	3,7 \pm 0,2 ^b	4,1 \pm 0,3 ^{bc}	0,029*	-0,313*
ΔE	0,0 \pm 0,0 ^a	1,1 \pm 0,2 ^b	1,2 \pm 0,5 ^{a,b}	1,5 \pm 0,4 ^{a,b}	2,8 \pm 1,2 ^{a,b}	1,3 \pm 1,5 ^{a,b}	0,034**	0,406
Avaliação Sensorial ($n=3 \times 7/dia$)	Dias de Armazenamento						p	
	0	1	2	3	4	7		
Aspeto								
Turvo	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,5 \pm 0,6 ^b	0,7 \pm 0,7 ^b	<0,001***	
Espero	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,2 ^{a,b}	0,1 \pm 0,2 ^{a,b}	0,2 \pm 0,4 ^b	0,005***	

Letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias (avaliação instrumental) e medianas (avaliação sensorial).

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

*** Valores de p de análises Kruskal-Wallis. As medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney U, quando a normalidade não foi confirmada pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

Tabela 7.15 Resultados obtidos nos parâmetros químicos avaliados para as amostras de sardinha ao natural (SN), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Parâmetros Avaliados (n=3/dia)	Dias de Armazenamento						p	r
	0	1	2	3	4	7		
Humidade (%)	68,6 \pm 1,0	69,9 \pm 1,1	69,7 \pm 1,5	67,6 \pm 0,5	68,7 \pm 1,2	70,1 \pm 1,0	0,104	
pH	6,65 \pm 0,04 ^a	6,93 \pm 0,04 ^b	6,97 \pm 0,05 ^b	6,81 \pm 0,05 ^c	6,76 \pm 0,06 ^c	6,62 \pm 0,06 ^a	< 0,001*	-0,390*
ABVT (mg N/100g amostra)	40,2 \pm 0,3 ^a	41,1 \pm 0,3 ^b	41,0 \pm 0,4 ^b	43,1 \pm 0,2 ^c	38,9 \pm 0,3 ^d	44,7 \pm 0,3 ^e	< 0,001*	0,586*
Aminas biogénicas (mg/kg amostra)								
<i>Putrescina</i>	2,7 \pm 0,7 ^a	3,2 \pm 1,1 ^a	4,5 \pm 0,3 ^b	5,0 \pm 0,5 ^b	5,3 \pm 1,0 ^b	7,7 \pm 0,4 ^c	< 0,001*	0,932**
<i>Histamina</i>	1,1 \pm 0,8 ^{a,b}	1,1 \pm 0,1 ^a	0,9 \pm 0,1 ^a	1,3 \pm 0,4 ^{a,b}	1,1 \pm 0,1 ^a	2,7 \pm 0,3 ^b	0,005*	0,745**
<i>Espermidina</i>	3,0 \pm 0,9 ^a	6,0 \pm 0,3 ^b	6,8 \pm 1,1 ^b	6,4 \pm 0,2 ^b	5,8 \pm 1,8 ^b	8,8 \pm 1,0 ^c	0,001*	0,745**
<i>Espermina</i>	2,2 \pm 0,9 ^a	7,0 \pm 0,6 ^b	6,2 \pm 1,2 ^b	6,7 \pm 1,2 ^b	6,7 \pm 0,7 ^b	6,2 \pm 1,5 ^b	0,001*	0,415
<i>Aminas Total</i>	10,5 \pm 0,8 ^a	17,7 \pm 0,3 ^b	18,4 \pm 2,4 ^b	18,8 \pm 1,0 ^b	19,8 \pm 2,7 ^b	25,6 \pm 2,0 ^c	< 0,001*	0,878**
<i>Índice de aminas biogénicas</i> [#]	3,8 \pm 1,0 ^a	4,3 \pm 1,1 ^{a,b}	5,5 \pm 0,2 ^{b,c}	6,3 \pm 0,8 ^c	6,4 \pm 0,9 ^c	10,4 \pm 0,7 ^d	< 0,001*	0,936**
Gordura (g/100g amostra)	5,77 \pm 2,90	4,08 \pm 1,95	6,13 \pm 0,65	5,52 \pm 0,67	5,92 \pm 1,21	4,30 \pm 0,96	0,517	-
<i>dos quais LC-PUFAs</i> (g/100g amostra)	1,93 \pm 1,07	1,48 \pm 0,61	2,19 \pm 0,24	2,01 \pm 0,13	2,22 \pm 0,40	1,71 \pm 0,38	0,584	-
TBARS (mg MDA/kg amostra)	3,54 \pm 0,18	3,38 \pm 0,82	3,26 \pm 0,32	3,37 \pm 0,14	4,24 \pm 0,95	4,40 \pm 0,88	0,203	-
Vitamina E (mg/100g amostra)	0,23 \pm 0,12	0,20 \pm 0,11	0,45 \pm 0,06	0,33 \pm 0,11	0,34 \pm 0,13	0,22 \pm 0,02	0,057	-

Diferentes letras na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias.

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

[#] Corresponde á soma de Putrescina + Cadaverina + Histamina + Tiramina

medida em que se tratam de atributos percebidos através da visão e da boca, estando a amostra íntegra, enquanto que para a determinação da humidade esta apresenta-se moída, ou seja, mais uniforme.

Relativamente aos valores de pH, verifica-se que o valor registado no último dia de armazenamento (6,62) foi semelhante ao obtido no momento de abertura (6,65), como comprovado estatisticamente (Tabela 7.15). Mas, apesar desta proximidade entre estes 2 valores, não foi observado um comportamento constante nos restantes dias de análise. Foi observado um ligeiro aumento passado 1 e 2 dias no frigorífico, sendo atingido um valor igual a 6,97, seguido de uma pequena diminuição gradual a partir do dia 3 até ao último dia de conservação, pelo que foi verificada uma correlação entre os diferentes valores fracamente negativa e significativa. Por sua vez, estas diferenças foram identificadas como estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Sensorialmente, alguns dos provadores consideraram que as amostras após 2 dias no frigorífico apresentavam um sabor ligeiramente ácido, o qual foi aumentando de forma gradual até ao último dia de armazenamento (Tabela 7.13). Esta evolução não vai ao encontro do pH avaliado instrumentalmente, na medida em que neste caso se observou uma ligeira oscilação ao longo do período de amostragem, sendo notável um aumento entre o primeiro e segundo dia no frigorífico. Tal como nas amostras anteriores, teria sido interessante analisar o valor da acidez livre, pois está mais correlacionada com as percepções sensoriais da acidez.

Tal como nas conservas de atum, o teor de ABVT foi utilizado como indicadore de deterioração proteica. Os valores obtidos demonstraram um aumento gradual até ao terceiro dia de armazenamento, seguido de uma diminuição ao quarto dia, voltando a ser acompanhado por um acréscimo aos 7 dias de refrigeração (Tabela 7.15). Os resultados apresentaram significado estatístico no período de armazenamento considerado ($p < 0,05$) e, apesar da oscilação verificada passado 4 dias, é possível observar uma tendência crescente, em que o valor registado no último dia é o mais alto (44,7mg N/100g), comparativamente aos restantes dias, inclusive no momento de abertura (40,2mg N/kg). Comparando os valores dos níveis de ABVT nestas amostras com os obtidos nas conservas de atum verificou-se que os valores registados nas conservas de sardinha são superiores. Contudo, e apesar do teor de ABVT para as amostras de SN no decorrer do período de armazenamento estar bastante próximo dos valores máximos referenciados para conservas de peixe, não ultrapassaram esse limite (45mg N/100g de peixe; Aubourg, 2001).

Segundo Shakila *et al.* (2005), pela avaliação do parâmetro de ABVT em sardinha (*Sardinella gibbosa*) fresca, cozinhada e em conserva logo após a receção ou término do processo aplicado e passado um período de tempo de 6 horas à temperatura ambiente, foi possível constatar que, no caso de sardinha enlatada, os valores de ABVT obtidos foram, em média, entre 20-30mg N/kg em ambos os momentos de análise, inferiores aos do presente estudo. Estas diferenças podem estar relacionadas, por exemplo, com as condições de armazenamento da matéria-prima, bem como o processo de cozedura a que as conservas são submetidas antes da esterilização ou com característica da própria sardinha, nomeadamente um maior teor proteico por 100g de produto, um fenómeno sazonal e natural, decorrente indiretamente do maior ou menor teor lipídico deste peixe.

O estudo desenvolvido por Uriarte-Montoya *et al.* (2010), cujo objetivo consistiu na avaliação dos indicadores de frescura e de deterioração de sardinhas “Monterey” (*Sardinops sagax caerulea*) ao longo do processo de enlatamento, também demonstrou que o teor de ABVT no decorrer das diferentes etapas do processo em transformação em conserva foi constante, rondando valores entre 25-30mg N/kg, inferiores aos observados no presente estudo. Contudo, analisando o trabalho publicado por Losada *et al.* (2006) os valores do presente estudo já se encontram abaixo dos valores apresentados por estes autores. Nesse estudo, tendo como finalidade avaliar as diferenças observadas entre amostras de sardinha (*Sardina pilchardus*) armazenadas em gelo (moído ou em cubos) como tratamento preliminar ao processo de enlatamento, os resultados obtidos para amostras de conservas de sardinha sem tratamento prévio nos diferentes tipos de gelo foram de 52,7mg N/kg, aumentando para um máximo de 56mg N/kg com a aplicação de armazenamento prévio em gelo.

Pela determinação individual das aminas biogénicas presentes nas amostras de SN, a putrescina, espermidina e espermina foram as que apresentaram valores mais elevados (Tabela 7.15). Para todas elas, bem como para a concentração total, observaram-se diferenças significativas no período de tempo considerado ($p < 0,05$), sendo o último dia de armazenamento o que apresentou concentrações mais altas. Passado 24 horas no frigorífico a espermina e espermidina foram acompanhadas por um aumento significativo nas suas concentrações, enquanto que na putrescina esse aumento só foi detetado ao segundo dia. No caso da histamina só ao sétimo dia no frigorífico é que foi observado um acréscimo mais acentuado. É assim de salientar que, após abertura da lata, a concentração total de aminas foi aumentando gradualmente, apresentando uma correlação positiva muito forte e altamente significativa com o tempo de refrigeração.

Conforme referido previamente, existem limites máximos regulamentados apenas para a presença de histamina no peixe. Como já descrito anteriormente, o Regulamento (CE) nº1441/2007 de 5 de Dezembro de 2007 refere que o limite máximo permitido para a presença de histamina em produtos de pesca de espécies de peixes associadas a um elevado teor de histidina (por exemplo peixes da família *Scombridae* e *Clupeidae*) é entre 100-200mg/kg. Além disso, mas já mais recentemente a FDA (2011) relata que o valor máximo permitido é de 50mg/kg. Em qualquer dos casos são valores muito distantes dos apresentados, mesmo ao fim de 7 dias de armazenamento.

Segundo Farag (2013), que avaliou o efeito de diferentes tempos de armazenamento sobre a formação de amins biogénicas em sardinha fresca, a concentração de histamina e putrescina na sardinha fresca foi de 1,0 e 8,0mg/kg. Os resultados obtidos no presente trabalho no momento de abertura, e no que respeita a estas 2 amins foram inferiores.

No que respeita ao índice de amins biogénicas, é observado um aumento gradual e estatisticamente significativo ($p<0,05$) ao longo do período de armazenamento considerado, sendo o valor inicial registado no momento de abertura de 3,8mg/kg, e no último dia de 10,4mg/kg. É ainda verificada uma correlação positiva muito forte (0,936) e altamente significativa ($p<0,01$) entre os valores obtidos, além de que estes se encontram abaixo do valor limite para amostras de peixe para o qual o produto apresenta uma qualidade aceitável (<50mg/kg) (Prester, 2011).

Correlacionando os parâmetros relativos à determinação do ABVT e amins biogénicas com os resultados microbiológicos e sensoriais, as amostras de SN foram consideradas como satisfatórias durante os 7 dias de armazenamento, tendo por base a avaliação de diferentes microrganismos, estando os valores do índice de amins biogénicas de acordo com os resultados microbiológicos obtidos. Pela análise sensorial só no último dia do período de avaliação considerado foi identificado nas amostras o cheiro a pútrido (Tabela 7.13), cuja alteração pode estar relacionada com a presença, mesmo em baixas concentrações e dentro dos limites máximos de aceitabilidade, de putrescina e amins voláteis, respetivamente.

Adicionalmente, a fração lipídica também foi alvo de avaliação. Pela análise da Tabela 7.15 verifica-se que o teor de gordura e de PUFA de cadeia longa, não demonstraram diferenças estatisticamente significativas ao longo dos 7 dias de armazenamento ($p>0,05$). De certa forma, ao apresenta-se “inteira”, quando comparada com as conservas de atum, os lípidos da sardinha estão mais “protegidos” do meio ambiente, mesmo após abertura da lata. Comparando com trabalhos publicados, é

notável que em conservas de sardinha a aplicação de processamentos térmicos tenha pouca influência na fração lipídica do produto. Segundo Selmi *et al.* (2008), que avaliaram o efeito da cozedura e enlatamento no teor lipídico de 2 tipos de peixe, nas amostras de sardinha a percentagem de gordura não foi afetada. De referir que as pequenas variações verificadas no presente estudo podem ser explicadas pelo facto de cada lata ser constituída por 3 sardinhas, e que, apesar de serem do mesmo lote e terem sido submetidas ao mesmo tratamento, as características intrínsecas de cada sardinha são variáveis, originando inevitavelmente alterações no produto. Comparando os valores das amostras de SN (Tabela 7.15) com os obtidos para as amostras de atum ao natural (AN) (Tabela 7.3), e tendo em consideração que em ambos os produtos não há uma fonte “externa” de gordura porque o molho é constituído por água e sal, a salmoura, verifica-se que no momento de abertura as sardinhas apresentam teores de gordura superiores (5,77g/100g) ao atum (0,34g/100g), o que se mantém nos restantes dias de análise. Esta é uma característica típica de cada produto, sendo a sardinha, e contrariamente ao atum, considerada um peixe “gordo” e por isso recomendada como parte de uma dieta saudável como fonte de EPA e DHA. Contudo, e de acordo com Bandarra *et al.* (1997), o teor em gordura da sardinha pode variar entre 1,2 e 18,4% (Bandarra *et al.*, 1997) dependendo da época do ano em que foi feita a captura da matéria-prima (Bandarra *et al.*, 1997; Marin *et al.*, 2010).

A determinação do teor de TBARS permitiu determinar a presença de produtos secundários de oxidação lipídica no decorrer do período de armazenamento. Na Tabela 7.15, tal como para os restantes parâmetros de avaliação das características lipídicas, não foram observadas diferenças significativas para este indicador de oxidação lipídica (TBARS) ($p>0,05$). Contudo, ao quarto e sétimo dia de armazenamento ocorreu um ligeiro aumento nos seus valores, mas sem significado estatístico, registando-se no último dia um valor de 4,40mg MDA/kg, ligeiramente superior ao obtido no momento de abertura, de 3,54mg MDA/kg. Nesta amostra o molho é apenas salmoura o que pode favorecer, conforme previamente discutido, a oxidação lipídica. O facto de não se observar uma correlação com o tempo de armazenamento poderá dever-se ao já elevado valor inicial no momento de abertura, não sendo possível comparar com o teor em fresco.

Na Tabela 7.15 os valores de vitamina E obtidos para as amostras de SN não variaram de forma estatisticamente significativas ($p>0,05$) ao longo do período de tempo considerado. Tal como mencionado para as amostras de conservas de atum, a vitamina E é uma mais valia para a integridade dos compostos lipofílicos presentes no produto. Como já foi referido, o facto de a sardinha estar “inteira” vai ajudar na “proteção” das suas

características lipídicas e consequentemente nos níveis de vitamina E. No segundo dia de armazenamento verificou-se o valor mais alto de vitamina E, que está concordante também com um teor de gordura mais alto no mesmo momento de análise, refira-se, ambos exclusivamente da sardinha. Nesta amostra apenas foi detetado α -tocoferol (não apresentado). No que respeita aos parâmetros químicos destinados à avaliação da deterioração lipídica, a abertura da lata e a conservação do seu conteúdo durante 7 dias no frigorífico não incrementou alterações significativas ($p>0,05$).

7.2.6 Sardinha em óleo vegetal (SO)

Análise Física e Sensorial

A Tabela 7.16 apresenta os valores relativos à avaliação instrumental da cor das amostras de sardinha em óleo vegetal (SO), bem como da avaliação sensorial. Para efeitos de armazenamento foi transferido todo o conteúdo da lata, sardinhas e óleo.

No decorrer do período de armazenamento foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) nas coordenadas L^* e b^* em ambas as partes avaliadas (interna e externa), e de a^* apenas na parte interior. Tal como nas amostras de SN (Tabela 7.13), as conservas SO também demonstraram que a parte exterior da sardinha apresenta valores mais altos de luminosidade, comparativamente à parte interior, sendo contudo inferiores aos apresentados na amostra de SN. Na parte externa e interna os valores de L^* oscilaram nos primeiros dias de conservação, mas ao terceiro e quarto dia, respetivamente, já foi clara a diminuição que prosseguiu até ao último dia de análise, correspondente a uma perda da luminosidade (mais baço). As oscilações observadas na fase inicial de armazenamento podem ser consequência direta da área de medição não ser totalmente homogênea devido, por exemplo, à presença de escamas mais brilhantes, sangue e zonas mais escuras na zona da espinha. No que respeita ao valor de b^* houve um decréscimo significativo logo após 24 horas na parte interior na sardinha, enquanto que na parte exterior o mesmo foi verificado apenas ao quarto dia de análise, estando este decréscimo associado a uma perda de tons amarelos e um ligeiro escurecimento. Além disso, o valor de a^* apresentou diferenças significativas ($p<0,05$) apenas na parte interior, podendo estar relacionado com a presença de zonas aderentes espinha mais avermelhadas, e que com o passar do tempo tendem para um tom mais escuro, com diminuição do tom avermelhado. Pela determinação da variação total da cor (ΔE), verifica-se que logo após 24 horas no frigorífico ocorre uma variação estatisticamente significativa ($p<0,05$) em ambas as partes e classificada como muito distinta ($\Delta E>3$) (Pathare *et al.*, 2013). No interior e exterior da sardinha os valores de ΔE

Tabela 7.16 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial das sardinhas em óleo vegetal (SO), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Avaliação Instrumental ($n=3 \times 9/\text{dia}$)		Dias de Armazenamento						p	r
		0	1	2	3	4	7		
Exterior	L^*	73,1 \pm 4,5 ^a	71,0 \pm 8,8 ^{a,b}	76,4 \pm 5,2 ^{b,c}	63,6 \pm 4,3 ^{c,d}	61,9 \pm 6,6 ^{c,d}	61,8 \pm 5,7 ^d	<0,001**	-0,524**
	a^*	-0,2 \pm 0,7	-0,6 \pm 0,9	-0,5 \pm 0,9	-0,6 \pm 0,7	-0,6 \pm 0,7	-0,7 \pm 0,9	0,393	-
	b^*	10,3 \pm 2,9 ^a	9,9 \pm 3,7 ^a	10,3 \pm 2,5 ^a	10,1 \pm 2,8 ^a	8,3 \pm 2,4 ^b	8,0 \pm 3,0 ^b	0,006*	-0,277**
	ΔE	0,0 \pm 0,0 ^a	9,5 \pm 5,1 ^b	8,8 \pm 5,3 ^b	10,7 \pm 4,7 ^b	11,5 \pm 5,3 ^b	13,0 \pm 6,6 ^b	<0,001**	0,510**
Interior	L^*	48,9 \pm 5,0 ^a	39,0 \pm 6,0 ^b	43,0 \pm 6,4 ^c	45,6 \pm 5,4 ^c	44,5 \pm 6,7 ^c	42,1 \pm 6,4 ^{b,c}	<0,001*	-0,121
	a^*	6,9 \pm 2,0 ^{a,c}	7,3 \pm 2,2 ^{a,b}	8,1 \pm 2,2 ^b	6,7 \pm 2,0 ^{a,c}	5,9 \pm 2,0 ^c	6,8 \pm 1,9 ^{a,c}	0,006*	-0,108
	b^*	19,3 \pm 2,5 ^a	13,7 \pm 2,5 ^b	15,2 \pm 2,2 ^c	15,8 \pm 2,0 ^c	14,8 \pm 2,9 ^{b,c}	14,7 \pm 2,5 ^{b,c}	<0,001*	-0,280**
	ΔE	0,0 \pm 0,0 ^a	10,8 \pm 4,5 ^b	9,7 \pm 5,8 ^b	7,7 \pm 5,3 ^b	8,8 \pm 4,1 ^b	10,4 \pm 8,5 ^b	<0,001**	0,326**
Avaliação Sensorial ($n=3 \times 7/\text{dia}$)		Dias de Armazenamento						p	
		0	1	2	3	4	7		
Alteração da Cor	Exterior	0,0 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,4 ^b	0,3 \pm 0,6 ^b	0,4 \pm 0,7 ^b	0,9 \pm 0,7 ^c	1,4 \pm 0,8 ^d	<0,001***	
	Interior	0,0 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,4 ^b	0,4 \pm 0,5 ^b	0,9 \pm 0,8 ^c	1,3 \pm 0,6 ^c	1,9 \pm 0,4 ^d	<0,001***	
Aspetto Exterior	Fibroso	0,0 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,4 ^b	0,2 \pm 0,4 ^b	0,4 \pm 0,5 ^b	0,3 \pm 0,5 ^b	0,3 \pm 0,5 ^b	0,043***	
	Perda de Brilho	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,6 \pm 0,8 ^b	1,4 \pm 0,7 ^b	<0,001***	
Cheiro	Oxidação	0,0 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,4 ^a	0,9 \pm 0,7 ^b	0,8 \pm 0,8 ^b	0,7 \pm 0,7 ^b	1,1 \pm 1,0 ^b	<0,001***	
	Pútrido	0,0 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,4 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,4 ^a	0,8 \pm 1,0 ^b	1,0 \pm 1,2 ^b	<0,001***	
Textura	Fibrosa	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,4 \pm 0,5 ^b	0,8 \pm 0,7 ^b	1,2 \pm 0,8 ^c	1,5 \pm 0,9 ^c	<0,001***	
Sabor	Ácido	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,3 \pm 0,6 ^b	0,3 \pm 0,6 ^b	0,5 \pm 0,8 ^b	0,7 \pm 0,9 ^b	0,001***	
	Pútrido	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,3 ^{a,b}	0,3 \pm 0,6 ^{b,c}	0,4 \pm 0,7 ^{b,c}	0,7 \pm 0,9 ^c	<0,001***	

Letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias (avaliação instrumental) e medianas (avaliação sensorial).

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

*** Valores de p de análises Kruskal-Wallis. As medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney U, quando a normalidade não foi confirmada pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

são muito próximos e, apesar de serem observadas pequenas oscilações, estas não apresentaram significado estatístico, sendo identificado como um comportamento constante após 24 horas até ao final do período de tempo considerado. Os valores correlacionam-se com o tempo de armazenamento de uma forma positiva e altamente significativa, tanto na parte exterior e como na parte interior.

Contrariamente às amostras de SN (Tabela 7.13), nas de SO foram identificadas sensorialmente alterações ao nível da cor em ambas as partes avaliadas logo após 24 horas de armazenamento (Tabela 7.16). No caso da parte externa associaram a uma descoloração e na parte interna a um escurecimento. Como tal, constata-se que os resultados sensoriais da cor observada na parte interna foram coerentes com os da análise instrumental, enquanto que na parte externa a alteração identificada sensorialmente não foi determinada pela avaliação instrumental. A luminosidade da parte exterior da sardinha já apresentou resultados concordantes em ambos os métodos, uma vez que pela análise sensorial foi observado um aumento na perda de brilho ao longo dos diferentes dias de conservação, apesar de só ter sido identificada por alguns provadores após 4 dias no frigorífico.

Na Tabela 7.16, além dos atributos relacionados com a cor e aspeto, os atributos sensoriais a nível do cheiro, textura e sabor avaliados demonstraram diferenças significativas ($p < 0,05$). O aspeto e textura mais seco/fibroso, e um ligeiro cheiro a oxidação e pútrido foram identificados logo após 24 horas de armazenamento. Por sua vez, o sabor ácido e a pútrido foi observado após 2 dias no frigorífico. Contudo, é de ressaltar que as variações observadas não foram sentidas pelos provadores de forma uniforme, o que aumentou a dispersão dos resultados, diminuindo a significância das diferenças aparentemente identificadas.

Além das alterações sensoriais identificadas nas sardinhas, as amostras de SO também demonstraram alterações no molho (Tabela 7.17). A partir do segundo e terceiro dia no frigorífico, o molho ficou mais turvo e mais espesso, respetivamente, sendo observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Contudo, o molho não foi posteriormente objeto de análise química. Juntamente com a avaliação sensorial, foram determinadas alterações pela medição instrumental da cor, sendo verificadas diferenças significativas apenas na coordenada a^* ($p < 0,05$), em que os valores apresentaram uma correlação negativa e altamente significativa com o tempo. Verificou-se uma diminuição, pouco acentuada, ao longo do período de armazenamento, registando-se no primeiro dia um valor igual a -0,5 e passado 7 dias igual a -0,8. Este comportamento pode estar

Tabela 7.17 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do molho das amostras de sardinha em óleo vegetal (SO), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Avaliação Instrumental (n=3/dia)	Dias de Armazenamento						p	r
	0	1	2	3	4	7		
L*	30,1 ± 2,2	29,6 ± 1,5	31,8 ± 1,3	30,1 ± 1,7	31,4 ± 1,2	31,0 ± 1,1	0,475	-
a*	-0,5 ± 0,1 ^a	-0,6 ± 0,1 ^{a,b}	-0,6 ± 0,1 ^{a,b}	-0,6 ± 0,0 ^a	-0,7 ± 0,2 ^{a,b}	-0,8 ± 0,1 ^b	0,029**	-0,698**
b*	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1	0,266	-
ΔE	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,3	1,8 ± 1,3	0,6 ± 0,4	1,4 ± 1,7	1,1 ± 0,8	0,339	-
Avaliação Sensorial (n=3x7/dia)	Dias de Armazenamento						p	
	0	1	2	3	4	7		
Aspeto								
Turvo	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,3 ^{a,b}	0,2 ± 0,4 ^{b,c}	0,4 ± 0,5 ^c	1,3 ± 0,7 ^d	<0,001	
Espesso	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,4 ^b	0,4 ± 0,5 ^b	1,1 ± 0,8 ^c	<0,001	

Letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias (avaliação instrumental) e medianas (avaliação sensorial).

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

*** Valores de p de análises Kruskal-Wallis. As medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney U, quando a normalidade não foi confirmada pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

relacionado com o aumento da turvação detetada sensorialmente, em que foram obtidos valores mais altos ao quarto e sétimo dia tanto pela análise instrumental como sensorial.

Análise Química

A humidade determinada nas amostras de SO não demonstrou diferenças significativas ($p>0,05$) ao longo dos diferentes dias de conservação (Tabela 7.18), mantendo-se praticamente constante ao longo dos dias mas com alguma dispersão de valores provavelmente relacionado com alguma variabilidade na retenção de molho (água de cozedura e óleo) ou características intrínsecas das próprias sardinhas. É importante frisar que os parâmetros sensoriais relativos ao aspeto e textura fibrosa, referenciados na Tabela 7.16, não estão correlacionados com a % de humidade presente no peixe.

No que respeita aos valores de pH, estes apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$). O seu comportamento não é gradual ao longo do período de armazenamento considerado, pois posteriormente à abertura da lata é verificada uma diminuição, com significado estatístico, até ao terceiro dia no frigorífico, seguida de um ligeiro aumento ao quarto dia, cujo valor se manteve constante até ao sétimo dia. Desta forma, o valor registado no último dia foi apenas ligeiramente inferior (6,52) ao obtido no primeiro dia de análise (6,64). Sensorialmente, alguns dos provadores consideraram que as amostras de SO mantidas 2 dias no frigorífico apresentavam um sabor ácido, que foi gradualmente aumentando até ao último dia de armazenamento (Tabela 7.18). Pela avaliação instrumental, os valores de pH registados foram também mais baixos no mesmo período de tempo, mas enquanto que na análise sensorial ocorreu uma intensificação do sabor ácido, na medição instrumental a diminuição do pH não se acentuou de forma gradual.

Perante a análise dos valores discriminados na Tabela 7.18, é de destacar que os valores de ABVT são indicativos de baixa degradação proteica e não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$), sendo o valor ao fim de 7 dias idêntico ao inicial. Os teores de ABVT obtidos para as amostras de SO são semelhantes aos das amostras de SN (Tabela 7.15), na fase inicial de armazenamento, estão também bastante próximos dos valores máximos referenciados para conservas de peixe, mas sem nunca os ultrapassar. Pela avaliação do estudo desenvolvido por Shakila *et al.* (2005), os valores de ABVT obtidos para conservas de sardinha (*Sardinella gibbosa*) variaram, em média, entre 20-30mg N/100g incluindo a análise da sardinha em fresco e após 6 horas de repouso pós-enlatamento. Tal como verificado previamente nas amostras de SN, os resultados obtidos no presente trabalho, de 43,8mg N/100g no momento de abertura das latas, são claramente superiores aos registados no estudo referido anteriormente. Esta

Tabela 7.18 Resultados obtidos nos parâmetros químicos avaliados para as amostras de sardinha em óleo vegetal (SO), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Parâmetros Avaliados (n=3/dia)	Dias de Armazenamento						p	r
	0	1	2	3	4	7		
Humidade (%)	58,8 \pm 0,7	57,7 \pm 2,5	61,7 \pm 1,1	58,2 \pm 2,2	58,2 \pm 2,1	58,6 \pm 0,2	0,128	-
pH	6,64 \pm 0,04 ^a	6,56 \pm 0,04 ^b	6,51 \pm 0,04 ^b	6,45 \pm 0,04 ^c	6,55 \pm 0,06 ^b	6,52 \pm 0,08 ^b	<0,001*	-0,234
ABVT (mg N/100g amostra)	43,8 \pm 0,6	44,0 \pm 1,1	41,9 \pm 0,6	43,1 \pm 1,2	44,3 \pm 0,7	43,8 \pm 0,8	0,053	-
Aminas biogénicas (mg/kg amostra)								
Putrescina	3,7 \pm 2,1	6,1 \pm 2,2	7,1 \pm 1,2	5,4 \pm 2,4	5,4 \pm 0,9	7,7 \pm 1,4	0,155	-
Cadaverina	0,9 \pm 0,0 ^a	1,1 \pm 0,1 ^{a,d}	1,9 \pm 0,7 ^{b,c}	1,2 \pm 0,1 ^{a,b,d}	2,1 \pm 0,5 ^c	1,7 \pm 0,4 ^{b,c,d}	0,014*	0,472*
Histamina	1,5 \pm 0,4 ^{a,b}	1,7 \pm 0,2 ^{a,b}	1,4 \pm 0,2 ^{a,b}	1,8 \pm 0,4 ^a	1,2 \pm 0,1 ^b	2,5 \pm 0,3 ^c	0,014*	0,548*
Espermidina	4,5 \pm 2,8 ^a	9,6 \pm 1,8 ^b	10,6 \pm 1,5 ^b	8,8 \pm 1,1 ^b	9,2 \pm 1,3 ^b	10,1 \pm 0,4 ^b	0,007*	0,458
Espermina	3,3 \pm 1,4 ^a	10,6 \pm 2,9 ^{a,b}	9,4 \pm 4,5 ^{a,b}	9,6 \pm 0,6 ^b	9,2 \pm 0,9 ^b	7,3 \pm 0,7 ^{a,b}	0,014**	0,141
Aminas Total	10,9 \pm 1,5 ^a	25,5 \pm 3,2 ^b	32,6 \pm 2,9 ^c	27,1 \pm 4,9 ^b	26,4 \pm 2,2 ^b	29,2 \pm 0,7 ^b	<0,001*	0,532*
Índice de aminas biogénicas[#]	5,1 \pm 0,4 ^{a,b}	7,7 \pm 1,0 ^{a,b}	10,5 \pm 0,9 ^{b,c}	8,5 \pm 2,7 ^b	8,8 \pm 1,5 ^b	11,8 \pm 1,7 ^c	0,003*	0,708**
Gordura (g/100g amostra)	13,68 \pm 0,84	13,40 \pm 1,35	12,63 \pm 2,35	13,75 \pm 1,00	11,81 \pm 0,41	12,34 \pm 1,38	0,448	-
dos quais LC-PUFAs (g/100g amostra)	2,67 \pm 0,26	2,04 \pm 0,49	2,14 \pm 0,74	2,08 \pm 0,39	2,06 \pm 0,13	2,19 \pm 0,15	0,468	-
TBARS (mg MDA/kg amostra)	3,75 \pm 0,45	4,04 \pm 0,39	3,60 \pm 0,32	3,91 \pm 0,27	4,22 \pm 0,71	3,99 \pm 0,47	0,635	-
Vitamina E (mg/100g amostra)	4,90 \pm 0,29	6,79 \pm 2,09	4,63 \pm 1,14	6,30 \pm 1,27	5,36 \pm 1,49	4,36 \pm 0,55	0,208	-

Diferentes letras na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias.

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

[#] Corresponde á soma de Putrescina + Cadaverina + Histamina + Tiramina

diferença nos resultados pode estar relacionada com o facto das espécies de sardinhas analisadas não serem as mesmas, uma vez que as sardinhas utilizadas nas amostras de SN e SO são de lotes diferentes.

Relativamente à concentração total de aminas biogénicas e ao índice de aminas biogénicas das amostras de SO, foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) no decorrer do tempo de armazenamento. A determinação individual das aminas biogénicas presentes nas amostras de SO revelou que a putrescina, espermidina e espermina eram as mais abundantes (Tabela 7.18), tal como verificado nas amostras de SN, sendo contudo de realçar a presença da cadaverina nestas amostras, uma vez que de todas as amostras até então analisadas, as conservas de SO foram as únicas em que foi quantificada a cadaverina. Contudo os seus valores, tal como os de histamina, foram sempre reduzidos ao longo do período de armazenamento. Para todas as aminas determinadas, com exceção da putrescina, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$). Contudo, na putrescina, tal como nas restantes, foi registado um valor superior no final em comparação com o obtido no momento de abertura, embora sem significado estatístico ($p > 0,05$). Além disso, foram verificadas pequenas oscilações nas concentrações das aminas avaliadas nos diferentes momentos de análise. No caso da histamina, esta encontra-se abaixo, em qualquer dia do período de tempo considerado, dos limites máximos sugeridos, de 100-200mg/kg segundo o Regulamento (CE) nº1441/2007 de 5 de Dezembro de 2007, ou de 50mg/kg de acordo com a FDA (2011). Comparando os valores obtidos para a histamina no presente trabalho com o estudo publicado por Selmi *et al.* (2008) constata-se que os valores são concordantes, para as amostras de SO a sua concentração no momento de abertura é igual a 1,5mg/kg e nas amostras de sardinhas enlatadas do estudo dado com exemplo, com 3 meses de armazenamento após fabrico, o valor era igual a 1,6mg/kg. Os mesmos autores relataram que conservas de sardinha com 6 meses de armazenamento apresentaram um valor de 2,3mg/kg.

No que respeita ao índice de aminas biogénicas, é claro um aumento ao longo dos diferentes dias de análise, sendo o valor obtido no dia da abertura da lata igual a 5,1mg/kg e passado 7 dias igual a 11,8mg/kg. Como tal, é notório que a abertura da lata e o armazenamento incrementou alterações no nível das aminas biogénicas. Mesmo assim, estes valores, em qualquer momento de análise, encontraram-se abaixo do valor limite para amostras de peixe para o qual o produto apresenta qualidade satisfatória ($< 50\text{mg/kg}$) (Prester, 2011).

Os parâmetros relativos à determinação do ABVT e aminas biogénicas podem ser correlacionados com os resultados microbiológicos e sensoriais. Microbiologicamente as amostras de SO foram consideradas satisfatórias ao longo do período de armazenamento considerado, e tendo em consideração os resultados obtidos para o índice de aminas biogénicas verifica-se que estes estão de acordo com os resultados microbiológicos. O sabor a pútrido foi identificado sensorialmente após 2 dias no frigorífico (Tabela 7.16), que pode estar relacionado com a presença de putrescina e aminas voláteis, apesar de estarem em baixas concentrações e dentro dos limites máximos de aceitabilidade, respetivamente.

Em todos os parâmetros químicos adotados para a avaliação da deterioração a nível lipídico não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (Tabela 7.18). Conforme seria de esperar, o teor de gordura determinado nas amostras de SO (11,8% a 13,7%) foi superior ao quantificado nas amostras de SN (4,1%-6,1%) (Tabela 7.15) onde apenas está presente a gordura natural do peixe. Contudo, e uma vez que as sardinhas estão “inteiras” no interior da lata, a capacidade de absorver molho não é igual à do atum conservado em lata (o atum apresenta-se em posta), verificando-se uma incorporação superior de gordura no atum em óleo do que na sardinha em óleo. Durante o tempo de armazenamento sob refrigeração a composição da gordura manteve-se estável, com um valor no momento de abertura de 13,68g/100g (total de lípidos), dos quais 2,67g/100g correspondem aos PUFA de cadeia longa. A ligeira redução em ambos os parâmetros não apresentou significado estatístico ($p > 0,05$), indicativo de um baixo nível de oxidação. De destacar contudo que adicionalmente aos PUFA com origem no peixe (EPA, DPA e DHA), existia ainda uma elevada quantidade de outros PUFA com origem no óleo adicionado. Na verdade os PUFA totais nos lípidos correspondiam em média a 51%, sendo 14% do DHA, seguido de 10% de EPA e mais de 30% de outros PUFA, nomeadamente 26% de ácido linoleico, 17% de ácido oleico e 3 % de ácido alfa-linolénico (dados não apresentados).

Os valores de TBARS, enumerados na Tabela 7.18, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas no decorrer do período de armazenamento ($p > 0,05$), não se demonstrando assim um aumento nos níveis de oxidação lipídica. Teria sido interessante conhecer o valor de TBARS no lote de sardinha fresco utilizado, para poder verificar se as diferenças se devem maioritariamente à espécie de sardinha ou ao seu processamento. Igualmente, apesar de não ser alvo do presente estudo, um acompanhamento da evolução do teor de TBARS com a evolução do tempo após manufatura teria sido interessante.

A Tabela 7.18 mostra que as variações nos valores de vitamina E obtidos para as amostras de SO não foram estatisticamente significativos ($p>0,05$) ao longo do período de armazenamento considerado. É de ressaltar o facto de, em comparação com os níveis de vitamina E das amostras de SN (Tabela 7.15), os obtidos para as amostras SO foram superiores, pela razão já explicada anteriormente: a sardinha absorve óleo do molho, e consequentemente os valores de vitamina E também serão maiores, devido principalmente aos valores mais altos de γ -tocoferol registados, representando 60% do teor total de vitamina E (não apresentado).

7.2.7 Sardinha em molho de tomate (ST)

Análise Física e Sensorial

Os resultados obtidos na avaliação instrumental e sensorial das amostras de sardinha em molho de tomate (ST) estão descritos na Tabela 7.19, sendo posteriormente discutidos os valores para o molho, separadamente na tabela 7.20.

Ao longo do período de armazenamento foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) nas coordenadas L^* e b^* em ambas as partes avaliadas (interior e exterior), e para a^* apenas na parte interior. Assim como para os outros 2 tipos de amostras de conservas de sardinha anteriormente abordadas, as ST também apresentaram valores mais altos de luminosidade na parte exterior, comparativamente à parte interior. Em ambas as partes e logo após 24 horas houve uma diminuição, com significado estatístico, que posteriormente se manteve constante até ao último dia no frigorífico, relacionado com uma perda da luminosidade (mais baço). Os valores de b^* foram acompanhados por um decréscimo significativo, associado a uma ligeira perda de tons amarelos, nas duas partes avaliadas e logo após o primeiro dia de conservação a temperaturas de refrigeração, seguidos de uma constância até ao sétimo dia. Na parte interior da sardinha, além destas 2 coordenadas, a^* também apresentou diferenças significativas ($p<0,05$), verificando-se uma diminuição passado 24 horas, por perda de tons vermelhos, que não se intensificou de forma gradual, tal como nas outras amostras de conservas de sardinha analisadas no contexto deste estudo. A determinação da variação total da cor (ΔE), demonstrou que passado 1 dia no frigorífico ocorre uma variação estatisticamente significativa ($p<0,05$) em ambas as partes e classificada como muito distinta ($\Delta E>3$) (Pathare *et al.*, 2013). É notório que na parte externa os valores desta variação da cor foram ligeiramente superiores em qualquer momento de análise no período de tempo considerado, pelo que foi mais intensa na parte da sardinha exposta ao ambiente externo.

Tabela 7.19 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial das sardinhas das em molho de tomate (ST), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Avaliação Instrumental ($n=3 \times 9/\text{dia}$)		Dias de Armazenamento						p	r
		0	1	2	3	4	7		
Exterior	L^*	$62,2 \pm 5,9^a$	$56,8 \pm 2,2^b$	$55,7 \pm 6,6^b$	$57,9 \pm 6,5^{a,b}$	$58,9 \pm 5,9^{a,b}$	$58,4 \pm 6,3^{a,b}$	0,001**	-0,062
	a^*	$11,8 \pm 3,7$	$10,9 \pm 2,5$	$10,6 \pm 3,7$	$10,2 \pm 3,3$	$10,9 \pm 3,6$	$10,3 \pm 2,6$	0,516	-
	b^*	$36,9 \pm 6,4^a$	$32,9 \pm 5,5^b$	$32,6 \pm 6,5^b$	$32,7 \pm 5,2^b$	$32,3 \pm 5,9^b$	$33,0 \pm 4,1^b$	0,032*	-0,145
	ΔE	$0,0 \pm 0,0^a$	$11,4 \pm 4,7^b$	$13,3 \pm 7,6^b$	$12,3 \pm 5,6^b$	$12,8 \pm 6,8^b$	$12,3 \pm 4,4^b$	<0,001**	0,375**
Interior	L^*	$53,9 \pm 3,6^a$	$48,0 \pm 3,0^b$	$48,4 \pm 5,4^b$	$48,1 \pm 3,4^b$	$49,1 \pm 1,8^b$	$48,9 \pm 3,3^b$	<0,001**	-0,216**
	a^*	$11,1 \pm 2,2^a$	$8,3 \pm 2,1^b$	$8,6 \pm 2,0^{b,c}$	$9,4 \pm 2,5^{b,c}$	$9,3 \pm 2,0^{b,c}$	$9,8 \pm 2,7^c$	<0,001*	-0,017
	b^*	$24,0 \pm 2,6^a$	$19,3 \pm 3,1^b$	$19,4 \pm 2,2^b$	$19,5 \pm 2,7^b$	$19,8 \pm 1,7^b$	$19,3 \pm 2,1^b$	<0,001*	-0,315**
	ΔE	$0,0 \pm 0,0^a$	$9,6 \pm 3,8^b$	$10,1 \pm 4,9^b$	$9,1 \pm 3,1^b$	$8,0 \pm 3,9^b$	$8,6 \pm 4,0^b$	<0,001**	0,304**
Avaliação Sensorial ($n=3 \times 7/\text{dia}$)		Dias de Armazenamento						p	
		0	1	2	3	4	7		
Aspetto Exterior	Fibroso	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,1 \pm 0,3^{a,b}$	$0,2 \pm 0,4^b$	0,002***	
	Perda de Brilho	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,3 \pm 0,5^b$	<0,001***	
Cheiro	Oxidação	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,2 \pm 0,4^b$	$0,7 \pm 0,8^b$	<0,001***	
Textura	Fibrosa	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,4 \pm 0,5^b$	$0,8 \pm 0,6^c$	<0,001***	
Sabor	Ácido	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	$0,3 \pm 0,5^b$	$1,1 \pm 0,8^c$	<0,001***	

Letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias (avaliação instrumental) e medianas (avaliação sensorial).

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

*** Valores de p de análises Kruskal-Wallis. As medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney U, quando a normalidade não foi confirmada pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

Pela análise sensorial apenas foram identificadas alterações, estatisticamente significativas ($p < 0,05$), na luminosidade da parte exterior da sardinha. Os provadores consideraram que houve uma perda do brilho/luminosidade apenas no último dia de armazenamento, contrariamente à avaliação instrumental em que se registou uma diminuição da luminosidade logo após 24 horas. Além disso, é de realçar que para as amostras de ST não foi observado pelos provadores em nenhum momento de análise um escurecimento ou descoloração das partes avaliadas. O molho de tomate, de certa forma “mascarou” possíveis alterações da cor, principalmente na parte externa, uma vez que como se trata de um molho pastoso, mesmo depois de escorrido pode sempre ficar agregado parcialmente à sardinha.

Adicionalmente, os atributos sensoriais relacionados com o cheiro, textura e sabor também demonstraram diferenças significativas ($p < 0,05$), nomeadamente cheiro a oxidado, textura mais seca/fibrosa e sabor ácido (Tabela 7.19). O aspeto exterior, além da perda de brilho já mencionada, foi associado a um aspeto mais seco/fibroso. Estas alterações foram detetadas sensorialmente apenas ao quarto dia de armazenamento, pelo que leva a constatar, que entre as conservas de sardinha avaliadas, as de ST foram as que apresentaram menos alterações identificadas pela avaliação sensorial. O molho de tomate, com ingredientes específicos que lhe conferem um sabor e odor mais intenso, ajudou a preservar determinadas características associadas a algum nível de deterioração, percebidas sensorialmente, na fase inicial de conservação no frigorífico. Contudo, as alterações observadas não foram sentidas pelos provadores de forma uniforme, pelo que houve um aumento da dispersão dos resultados e consequente diminuição da significância das diferenças identificadas.

Relativamente à avaliação instrumental e sensorial do molho foram observadas diferenças significativas apenas pela análise sensorial ($p < 0,05$) (Tabela 7.20). Ao quarto dia de armazenamento alguns provadores consideraram que o molho de tomate ficou mais líquido e apresentou um certo nível de descoloração. Apesar da variação total da cor ter aumentado após 24 horas no frigorífico, esta não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) ao longo do período de armazenamento considerado e não teve significado instrumental.

Análise Química

Pela análise da Tabela 7.21 é possível verificar que nas amostras de ST o teor de humidade não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) nos diferentes dias de conservação. Os seus valores mantiveram-se constantes, apesar de se observarem pequenas oscilações, em que, por exemplo ao quarto dia, se registou o valor mais baixo.

Tabela 7.20 Resultados obtidos na avaliação instrumental dos parâmetros da cor (L^* , a^* , b^* , ΔE) e avaliação sensorial do molho das amostras de sardinha em molho de tomate (ST), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Avaliação Instrumental (n= 3/dia)	Dias de Armazenamento						p	r
	0	1	2	3	4	7		
L*	35,4 ± 1,3	35,0 ± 1,7	35,9 ± 1,2	36,3 ± 1,0	35,6 ± 1,2	35,2 ± 1,2	0,807	-
a*	17,6 ± 1,1	17,7 ± 0,4	17,6 ± 0,9	17,2 ± 0,8	17,9 ± 1,0	17,5 ± 0,7	0,949	-
b*	19,6 ± 1,2	20,3 ± 2,0	20,4 ± 1,2	21,1 ± 0,3	20,9 ± 1,2	20,4 ± 0,8	0,746	-
ΔE	0,0 ± 0,0	2,3 ± 0,3	2,3 ± 1,1	3,0 ± 0,7	3,0 ± 1,2	2,3 ± 0,8	0,339	-
Avaliação Sensorial (n=3x7/dia)	Dias de Armazenamento						p	
	0	1	2	3	4	7		
Aspeto								
Descoloração	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,5 ^b	0,5 ± 0,5 ^b	<0,001***	
Líquido	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,5 ^b	1,0 ± 0,6 ^c	<0,001***	

Letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias (avaliação instrumental) e medianas (avaliação sensorial).

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

*** Valores de p de análises Kruskal-Wallis. As medianas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney U, quando a normalidade não foi confirmada pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$).

Tabela 7.21 Concentração de aminas biogénicas (mg/kg amostra) presentes nas amostras de sardinha em molho de tomate (ST), ao longo de 7 dias de armazenamento a 4°C (valor médio \pm desvio padrão)

Parâmetros Avaliados (n=3/dia)	Dias de Armazenamento						p	r
	0	1	2	3	4	7		
Humidade (%)	61,7 \pm 1,1	62,9 \pm 0,6	61,8 \pm 0,4	62,5 \pm 0,2	60,0 \pm 0,7	62,0 \pm 0,8	0,336	-
pH	5,95 \pm 0,05	5,93 \pm 0,07	5,89 \pm 0,03	5,87 \pm 0,11	5,94 \pm 0,11	5,90 \pm 0,08	0,484	-
ABVT (mg N/100g amostra)	36,2 \pm 0,4	36,0 \pm 1,2	36,3 \pm 0,6	35,6 \pm 1,3	35,9 \pm 0,4	35,3 \pm 1,1	0,767	-
Aminas biogénicas (mg/kg amostra)								
<i>Putrescina</i>	7,4 \pm 0,5 ^a	10,9 \pm 0,9 ^b	11,2 \pm 1,4 ^{b,c}	11,8 \pm 1,4 ^{b,c}	11,2 \pm 0,8 ^{b,c}	12,9 \pm 0,6 ^c	<0,001*	0,727**
<i>Cadaverina</i>	1,0 \pm 0,2 ^a	1,2 \pm 0,6 ^{a,b}	0,9 \pm 0,5 ^{a,b}	1,1 \pm 0,4 ^a	2,3 \pm 1,1 ^{a,b}	3,1 \pm 0,0 ^b	<0,001**	0,780**
<i>Histamina</i>	1,7 \pm 0,2 ^a	1,6 \pm 0,1 ^a	1,7 \pm 0,2 ^a	1,5 \pm 0,3 ^a	1,7 \pm 0,2 ^a	3,1 \pm 0,1 ^b	<0,001*	0,789**
<i>Espermidina</i>	3,4 \pm 0,4 ^a	6,2 \pm 0,4 ^{b,c}	6,6 \pm 1,1 ^b	6,1 \pm 0,4 ^{b,c}	5,0 \pm 0,3 ^c	5,7 \pm 1,2 ^{b,c}	0,002*	0,237
<i>Espermina</i>	2,4 \pm 0,5 ^a	6,0 \pm 0,4 ^b	5,7 \pm 0,4 ^b	5,0 \pm 0,7 ^{b,c}	4,4 \pm 0,3 ^c	4,1 \pm 1,1 ^c	<0,001*	0,046
Aminas Total	16,0 \pm 0,6 ^a	25,8 \pm 0,5 ^b	26,1 \pm 2,5 ^b	25,3 \pm 1,1 ^b	24,5 \pm 1,1 ^b	29,7 \pm 2,3 ^c	<0,001*	0,710**
Índice de aminas biogénicas[#]	9,9 \pm 0,1 ^a	13,6 \pm 0,5 ^b	13,8 \pm 1,0 ^b	14,3 \pm 2,0 ^b	15,1 \pm 1,6 ^b	19,1 \pm 0,7 ^c	<0,001*	0,896**
Gordura (g/100g amostra)	10,31 \pm 1,28 ^a	7,62 \pm 0,97 ^b	9,69 \pm 0,81 ^a	9,69 \pm 0,16 ^a	10,23 \pm 0,65 ^a	10,36 \pm 0,71 ^a	0,014*	0,342
dos quais LC-PUFAs (g/100g amostra)	3,62 \pm 0,51 ^a	2,53 \pm 0,52 ^b	3,49 \pm 0,44 ^a	3,18 \pm 0,24 ^{a,b}	3,69 \pm 0,29 ^a	3,73 \pm 0,20 ^a	0,020*	0,364
TBARS (mg MDA/kg amostra)	1,96 \pm 0,40 ^a	1,86 \pm 0,23 ^a	2,50 \pm 0,65 ^{a,b}	3,44 \pm 1,29 ^{b,c}	3,35 \pm 0,29 ^{b,c}	3,80 \pm 0,37 ^c	0,012*	0,742**
Vitamina E (mg/100g amostra)	1,61 \pm 0,11	1,68 \pm 0,21	1,62 \pm 0,14	1,46 \pm 0,18	1,67 \pm 0,23	1,25 \pm 0,12	0,063	-

Diferentes letras na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre médias.

* Valores de p de análises one-way ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, após confirmação da homogeneidade de variância através do teste de Levene ($p > 0,05$).

** Valores de p de análises one-way ANOVA com correção de Welch. As médias foram comparadas pelo teste Dunnett C, quando a homogeneidade de variância não foi confirmada pelo teste de Levene ($p > 0,05$). A correlação de Pearson (identificada na tabela como r) é significativa para um nível de 0,01 (** p) ou nível de 0,05 (* p).

[#] Corresponde á soma de Putrescina + Cadaverina + Histamina + Tiramina

Estas ligeiras oscilações podem estar relacionadas com o facto de o molho não ter sido eficientemente escorrido ou com as características intrínsecas das próprias sardinhas (restos de água de cozedura, por exemplo). Tal como para as outras amostras de sardinha, os atributos sensoriais relativos ao aspeto e textura fibrosa (Tabela 7.19) não estão correlacionados com a % de humidade presente no peixe.

Os valores de pH também não demonstraram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) ao longo do período de armazenamento considerado (Tabela 7.21). O valor registado no primeiro dia de análise foi igual a 5,95, mantendo-se estável no decorrer dos restantes dias em que no último dia o seu valor foi igual a 5,90, sendo contudo de referir que foram os valores mais baixos verificados em todas as amostras. Assim, é possível constatar que a abertura da lata e o armazenamento do seu conteúdo em embalagens de plástico apropriadas no frigorífico não potenciou a alteração do pH. Sensorialmente, alguns provadores consideraram que as amostras de ST mantidas 4 dias no frigorífico apresentavam um sabor ácido, que aumentou de forma significativa até ao último dia de armazenamento (Tabela 7.19). O mesmo não se verificou pela avaliação instrumental, em que não houve variação nos valores de pH.

Debruçando agora a atenção para a determinação do ABVT, verifica-se que este se manteve estável no decorrer dos dias de análise, não se verificando diferenças significativas ($p>0,05$) (Tabela 7.21). Como tal, nas amostras de ST não foram identificadas alterações a nível da fração proteica, no que respeita às aminas voláteis. Os teores de ABVT obtidos para estas amostras são inferiores aos das amostras de SN (Tabela 7.15) e SO (Tabela 7.18), pelo que é possível constatar que o molho de tomate pode ter influenciado nas diferenças de ABVT observadas entre as amostras de conservas de sardinha avaliadas. Neste caso, os valores registados já se encontram mais abaixo dos valores máximos referenciados para conservas de peixe (40-45mg N/100g), com uma média de 35mg N/100g.

No que respeita ao outro parâmetro químico destinado também para a avaliação da deterioração, a concentração total de aminas biogénicas e, indiretamente, o índice de de aminas biogénicas, observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) ao longo do tempo de conservação para as amostras de ST, e os valores correlacionaram-se com o tempo de armazenamento de uma forma fortemente positiva e altamente significativa (Tabela 7.21).

Pela determinação individual das aminas biogénicas nas amostras de ST verifica-se que todas elas foram acompanhadas por diferenças estatisticamente significativas ao

longo do período de armazenamento considerado ($p < 0,05$) (Tabela 7.21). Nestas amostras foram identificadas a putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e espermina. No último dia de análise todas elas demonstraram valores mais altos, comparativamente aos registados no momento de abertura, sendo observado um aumento gradual, com exceção da histamina que só ao sétimo dia foi registado um acréscimo com significado estatístico. Os valores da putrescina, cadaverina, histamina e concentração total de aminas biogénicas correlacionaram-se de uma forma fortemente positiva e altamente significativa com o tempo de armazenamento. É de ressaltar a presença de maiores concentrações de putrescina nas amostras de ST, do que nas amostras de SN (Tabela 7.15) e SO (Tabela 7.18), bem como em comparação com as restantes aminas identificadas. Tal facto pode ser correlacionado com a presença do molho de tomate. Nas amostras de conservas de AV foram observadas também concentrações mais elevadas de putrescina (Tabela 7.9), que foram associadas à presença de vegetais na conserva. De acordo com Ali *et al.* (2011), o teor de putrescina em tomate fresco é de 10,6mg/kg e em concentrado de tomate é superior, de 25,9mg/kg. No momento de abertura o valor de putrescina registado no presente trabalho foi igual a 7,4mg/kg. No que respeita à histamina, esta encontra-se abaixo, em qualquer momento de análise, dos limites máximos referidos previamente.

Relativamente ao índice de aminas biogénicas é verificado um aumento no decorrer dos diferentes dias de análise, em que, logo após 24 horas e do quarto para o último dia o acréscimo observado apresentou significado estatístico. O valor obtido no dia da abertura da lata foi igual a 9,9mg/kg e passado 7 dias igual a 19,1mg/kg. Como tal, é notório que a abertura da lata e exposição a diferentes condições incrementou ao desenvolvimento de alterações ao nível das aminas biogénicas. Apesar deste aumento no índice de aminas biogénicas, este encontra-se abaixo, em qualquer momento de análise, do valor limite para amostras de peixe para o qual o produto apresenta qualidade aceitável (<50mg/kg) (Prester, 2011).

Os parâmetros relativos à determinação do ABVT e aminas biogénicas estiveram concordantes com os resultados microbiológicos e sensoriais, já que as amostras de ST foram consideradas como satisfatórias durante os 7 dias de armazenamento, tendo por base a avaliação de diferentes microrganismos, estando os valores do índice de aminas biogénicas de acordo com os resultados microbiológicos determinados.

Os teores de gordura obtidos para as amostras de ST demonstraram diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo dos diferentes dias de análise (Tabela 7.21). Por sua vez, estas diferenças foram exclusivamente devidas à presença de um valor mais baixo no dia

1 no frigorífico, e não por um comportamento gradual no período de tempo avaliado. Esta redução deverá ter sido resultante essencialmente das características intrínsecas das sardinhas e minoritariamente das alterações extrínsecas ao produto. No caso dos PUFA's, é verificada a mesma situação, em que são identificadas estatisticamente diferenças significativas, mas devido ao valor inferior registado também após 24 horas. De facto, este tipo de produto manteve as suas propriedades lipídicas, no que toca ao teor lipídico, inclusive dos PUFA's de cadeia longa, apesar das diferenças observadas. Nesta amostra verifica-se que a contribuição da gordura do molho é significativa porque o teor em gordura nas amostra rondou os 7,6% a 10,4%, superior ao da sardinha ao natural (4,1% a 5,9%) mas claramente inferior ao da sardinha em óleo (11,8% a 13,8%). Também neste caso os PUFA's de cadeia longa representam 35% dos ácidos gordos totais e os PUFA's totais representam 47%, indicativos da forte presença dos lípidos de origem marinha. É interessante realçar que, por 100 g de produto, as sardinhas em tomate são as que apresentam maior quantidades de lípidos de cadeia longa (cerca de 3,4g/100g). Não se conhecendo o valor em fresco das sardinhas utilizadas no fabrico desta conserva, poderá ser indicador de uma menor degradação destes componentes logo durante o processo de enlatamento, e por isso superiores logo no momento de abertura.

Os valores de TBARS expostos na Tabela 7.21 demonstram diferenças estatisticamente significativas no decorrer do período de conservação ($p < 0,05$). É observado um aumento gradual ao longo do tempo, no momento de abertura o valor registado é de 1,96mg MDA/kg e no último dia igual a 3,80mg MDA/kg. Além disso é verificada uma correlação positiva entre os valores dos diferentes dias e altamente significativa. Contrariamente às outras 2 amostras de sardinha, SN e SO, nas amostras de ST a abertura da lata e o armazenamento do seu conteúdo numa embalagem de plástico adequada, a temperaturas de refrigeração incrementou um aumento nos teores de oxidação lipídica.

Os teores de vitamina E foram os únicos que a nível dos parâmetros lipídicos avaliados para as amostras de ST não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) (Tabela 7.21). Os valores mantiveram-se constantes no período de armazenamento considerado, apesar de no último dia ter sido determinado um valor mais baixo (1,25mg/100g) do que no momento de abertura (1,61mg/100g). Apesar de ter ocorrido uma diminuição da capacidade antioxidante no último dia, esta não demonstrou significado estatístico. O α -tocoferol representou mais de 94%, com vestígios de γ -tocoferol (não apresentado).

7.3 Discussão integrada

No seguimento da discussão individual dos resultados obtidos nos parâmetros microbiológicos, sensoriais, físicos e químicos para as amostras de conservas avaliadas, considerou-se importante fazer uma abordagem geral comparativa de forma a determinar qual o prazo de validade após abertura dos diferentes produtos e perceber quais os parâmetros determinantes nessa definição.

A tabela 7.22 reúne a informação dos 7 produtos analisados, assinalando, caso a caso, qual foi o primeiro dia em que se verificaram alterações significativas em relação ao momento de abertura. Em alguns casos não foram detetadas alterações, sendo por isso assinalado com (+7), indicativo que seria necessário prosseguir com mais dias de estudo. Contudo, dado que na generalidade dos casos existiu sempre um parâmetro com alterações significativas ao fim do dia 1 ou 2, não faria sentido prosseguir com as restantes análises para o objetivo do presente estudo. Também se reforça que as análises microbiológicas deram todas conforme, não sendo por isso fator determinante na definição do prazo de validade após abertura.

Pela análise da Tabela 7.22 e para as amostras de atum ao natural (AN), verifica-se que houve alterações significativas ($p < 0,05$) logo no dia 1, simultaneamente para parâmetros sensoriais, físicos, e químicos. Os parâmetros sombreados, relativos à análise sensorial, são determinantes para a rejeição do produto por parte do consumidor. De facto, as alterações a nível do cheiro e sabor têm um papel mais decisivo nessa rejeição, comparativamente à cor, por exemplo, onde, apesar de se verificarem alterações significativas estas não se desviam das alterações que o consumidor está habituado pelo armazenamento sob refrigeração, nomeadamente uma ligeira alteração da cor. A perceção de alteração do cheiro poderá estar associada a um ligeiro aumento das aminas biogénicas que não se traduziu numa alteração do índice de aminas biogénicas (apenas ocorreu no dia 3) e, por isso, não foi valorizado. A vitamina E já demonstrou alterações após 24 horas, mas não foi o parâmetro preponderante na decisão do prazo de validade. Tendo em conta o período de tempo em que ocorreram estas alterações, pode afirmar-se que o produto em causa deve ser consumido, preferencialmente, no próprio dia de abertura. A sua conservação no frigorífico durante 24h é possível, pois não coloca em causa a segurança do consumidor, mas as alterações sensoriais poderão ser perceptíveis para alguns consumidores, o que alterará a perceção da qualidade do produto, sendo por isso de evitar.

Tabela 7.22 Dia, após abertura, em que foi verificada uma alteração na estabilidade microbiológica, física, sensorial ou química, para os diferentes produtos avaliados

ANÁLISES		AN	AO	AV	AM	SN	SO	ST
Microbiológica	Aeróbios mesófilos	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Aeróbios psicrófilos	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Aeróbios termófilos	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Anaeróbios sulfito-redutores mesófilos	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Anaeróbios sulfito-redutores termófilos	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sensorial	Molho							
	<i>Aspetto</i>	1	3	(+7)	(+7)	4	3	4
	Peixe							
	<i>Cor</i>	1	1	4	1	7	1	(+7)
	<i>Aspetto</i>	1	2	7	2	4	1	7
	<i>Textura</i>	1	2	4	1	2	2	4
	Vegetais							
	<i>Cor</i>	-	-	4	1	-	-	-
	<i>Textura</i>	-	-	7	1	-	-	-
	Todo o conteúdo da lata							
	<i>Cheiro</i>	1	2	4	1	4	2	4
	<i>Sabor</i>	1	3	4	1	3	2	4
Física	Peixe	1	1	1	1	1	1	1
	Molho	1	2	-	-	1	7	(+7)
	Vegetais	-	-	1	1	-	-	-
Química	Humidade	(+7)	1	(+7)	(+7)	(+7)	(+7)	(+7)
	pH	4	4	1	2	1	1	(+7)
	ABVT	(+7)	(+7)	4	1	1	(+7)	(+7)
	Índice de aminas biogénicas	3	(+7)	(+7)	1	2	2	1
	Gordura	(+7)	1	(+7)	(+7)	(+7)	(+7)	1
	<i>LC-PUFAs</i>	(+7)	(+7)	(+7)	3	(+7)	(+7)	1
	TBARS	3	4	(+7)	3	(+7)	(+7)	3
	Vitamina E	1	1	2	(+7)	(+7)	(+7)	(+7)
	Compostos Fenólicos	-	-	2	3	-	-	-
Prazo de Validade Após Abertura		0	1	3	0	2	1	3

✓ Produto com qualidade satisfatória

(+7) Não foi verificada alteração durante os 7 dias do ensaio

- Não foi feita a determinação do parâmetro

■ Parâmetros mais relevantes na determinação do prazo de validade

No que respeita ao atum em óleo vegetal (AO), é de salientar que também se registaram importantes alterações no parâmetro sensorial referente ao cheiro, mas neste caso apenas foram detetadas passado 2 dias de armazenamento no frigorífico. Apesar de se verificarem igualmente alterações na cor do produto, quer sensorial quer instrumental logo no primeiro dia, estas foram reduzidas e associadas a fenómenos naturais como uma ligeira perda de brilho. As alterações químicas foram também muito reduzidas e mais tardias que as qualidades sensoriais. Assim, neste produto, a presença do óleo como molho de recobrimento conferiu proteção adicional ao atum, sendo possível garantir a sua conservação em refrigeração por 24h. Caso o consumidor opte por prolongar para além desse período, poderá notar alguma alteração no sabor, ainda que ligeira.

O atum com milho e feijão vermelho (AV) apresentou alterações a nível sensorial numa fase mais tardia, comparativamente às amostras de atum atrás mencionadas. Na verdade, só passado 4 dias no frigorífico o cheiro e sabor apresentaram alterações associadas a um nível de deterioração. Adicionalmente, um dos parâmetros relacionados com a deterioração proteica, nomeadamente o ABVT também identificou mudanças no produto, mas só no dia 4 é que as alterações apresentaram significado estatístico ($p < 0,05$). Desta forma, esta conserva pode ser consumida num período até 3 dias após abertura da lata.

Relativamente às amostras de atum com salada russa e maionese (AM), as alterações ocorridas foram observadas maioritariamente logo no dia 1. Por exemplo, o cheiro e sabor foram determinantes, tal como nas outras amostras de atum, na decisão do prazo de validade após abertura. Além disso, para esta conserva o teor de ABVT determinado foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) logo após 24 horas, comportamento este concordante com os dois parâmetros sensoriais anteriormente descritos. No índice de aminas biogénicas também foram identificadas alterações passado 24 horas de armazenamento. Por sua vez, apesar destes parâmetros estarem concordantes entre si, a análise sensorial foi novamente muito importante para a decisão do prazo de validade desta conserva. Tendo estes factos em consideração, o atum com salada russa e maionese deve ser consumido preferencialmente no próprio dia de abertura. Se for mantido até 24 horas no frigorífico não irá prejudicar a saúde do consumidor, mas será acompanhado por alterações sensoriais, provavelmente detetadas por alguns consumidores, e consequente rejeição do produto.

Nas conservas de sardinha ao natural (SN) a cor manteve-se muito estável e foi identificada uma alteração no sabor apenas após 3 dias de armazenamento. Contudo, o teor em ABVT e índice de aminas biogénicas demonstraram um nível de deterioração após 1 e 2 dias no frigorífico, respetivamente, ambos indicativos de alguma degradação proteica. O pH também reduziu ligeiramente logo no primeiro dia mas sem associação sensorial. No que respeita aos parâmetros lipídicos, tão importantes na sardinha, não foram detetadas perdas de PUFA de cadeia longa por oxidação, corroboradas pela manutenção do teor em vitamina E e TBARS. Como já foi referido, estas alterações nos parâmetros químicos não colocam em risco a saúde do consumidor, pelo que pode manter esta conserva 2 dias no frio. Caso o consumidor pretenda prolongar este período de tempo, é importante ter em consideração que pode ocorrer alterações a nível sensorial. De referir que esta conserva deve ser mantida com o molho para evitar que seque.

No que toca às conservas de sardinha em óleo vegetal (SO) verifica-se uma evolução muito semelhante nos parâmetros de degradação proteica, com aumento do ABVT e índice de aminas biogénicas ao segundo dia, e alteração do pH. Contudo, foi mais uma vez a nível sensorial onde foram detetadas as alterações principais decorrentes da abertura da embalagem e posterior armazenamento a temperaturas de refrigeração. Para além de alteração do aspeto e da cor, o sabor e o cheiro foram os parâmetros sensoriais mais determinantes na escolha do prazo de validade sendo de referir que no dia 2 já foram identificadas alterações associadas a um nível de deterioração. Assim, após abertura, este produto deve ser consumido até um máximo de 2 dias, podendo o consumidor mais sensível já notar alterações no cheiro e sabor.

Entre as amostras de sardinha avaliadas, as sardinhas em molho de tomate (ST) foram as que demonstraram alterações sensoriais numa fase mais tardia, apenas no dia 4. No entanto, o índice de aminas biogénicas destas conservas sofreu alterações passado 24 horas e contrariamente às amostras anteriores, verificaram-se alterações na componente lipídica mais precocemente, nomeadamente no teor em lípidos da sardinha e na quantidade de PUFA de cadeia longa, coerente com a alteração nas TBARS detetadas no dia 3. Como estes parâmetros retratam o nível de oxidação lipídica esta alteração pode, em certo ponto, ser detetada sensorialmente pelo consumidor, apesar de no presente trabalho os provadores só terem identificado alterações sensoriais a partir do dia 4. Por conseguinte, apesar destas alterações a nível químico o consumidor pode manter esta conserva, após abertura, num período de 3 dias.

É de ressaltar que o prazo de validade sugerido para cada conserva avaliada foi verificado em apenas um lote de cada produto e no procedimento de preservação imediatamente após abertura da lata todo o seu conteúdo foi colocado num recipiente de plástico próprio para produtos alimentares e armazenado no frigorífico. Numa situação real, em casa do consumidor poderão não serem cumpridos estes pressupostos, impedindo a utilização destes valores de referência. Nomeadamente é de salientar o tempo de espera até à refrigeração, a manutenção do molho e o estado de preservação dos próprios recipientes utilizados na conservação.

Pela avaliação da estabilidade microbiológica, física, química e sensorial das conservas de atum e sardinha estudadas, foi possível demonstrar que nem todos os métodos adotados foram determinantes na escolha do prazo de validade após abertura das latas. A avaliação microbiológica não permitiu definir o momento em que o produto é considerado como não satisfatório no período de armazenamento considerado no contexto deste trabalho. O facto de ser um produto comercialmente estéril, o processamento térmico a que é submetido aquando da transformação em conserva determina que a sua contaminação microbiológica esteja maioritariamente dependente das práticas de manipulação e conservação em torno do ambiente doméstico no momento da abertura da lata.

Os métodos físicos, químicos e sensoriais já foram importantes na determinação do prazo de validade após abertura. Contudo, nem todos os parâmetros avaliados contribuíram de igual forma para a identificação das alterações decorrentes do tempo de conservação no frigorífico. O teor em humidade ou mesmo o pH variaram de forma pouco significativa. Também a degradação lipídica foi pouco visível, sendo um pouco mais perceptível a degradação proteica, quer pelo TBARS quer pelo índice de aminas biogénicas. Contudo, é importante salientar o papel crucial desempenhado pela análise sensorial na determinação do prazo de validade. De facto, tratou-se sempre da determinação mais sensível e determinante na decisão, e nem sempre se mostrou correlacionada com a avaliação instrumental.

O facto da análise sensorial se a única forma que o consumidor tem para avaliar a qualidade de um produto alimentar e de ser esta precisamente a análise determinante na definição do prazo de validade é o garante de que nunca serão atingidos limites críticos do ponto de vista da segurança alimentar, dado que ocorrerá naturalmente a sua rejeição pelo consumidor antes desse momento.

Conclusão

O prazo de validade é uma característica integrante de cada produto alimentar nas condições de armazenamento definidas. Contudo, após abertura da embalagem, o produto alimentar fica sujeito a alterações distintas das que apresentava na embalagem e condições originais, com alterações ao nível da sua estabilidade. A definição da validade após abertura não é uma exigência comum, mas no caso de conservas de peixe poderá ser uma informação importante para o consumidor, sendo necessário um estudo integrado de todas as causas de deterioração, incluindo as do ponto de vista sensorial, físico, químico e microbiológico.

Neste estudo foram avaliadas diferentes conservas de peixe, nomeadamente de atum e sardinha, demonstrando prazos de validade distintos após abertura da lata, sob refrigeração, consoante o tipo e características da conserva em causa. De facto, o tipo de peixe e o seu modo de apresentação na lata (inteiro e com pele no caso da sardinha, e em posta e sem pele no caso do atum) e o tipo de molho (salmoura, óleo vegetal, molho de tomate e maionese) influencia a estabilidade do produto. Adicionalmente, o tempo de espera até à refrigeração, a manutenção do molho e o estado de preservação dos próprios recipientes utilizados na conservação também contribuem de igual forma para a qualidade do produto. Pela avaliação da estabilidade microbiológica todas as amostras foram consideradas com qualidade satisfatória no período de tempo avaliado.

No contexto deste trabalho verificou-se também que nem todos os parâmetros avaliados foram determinantes na determinação do prazo de validade. Os métodos sensoriais, físicos e químicos avaliados permitiram verificar alterações com o tempo de armazenamento e assim contribuir, de forma coordenada, para determinar esse mesmo prazo de validade. De entre estes últimos métodos, a análise sensorial foi a que demonstrou os parâmetros mais preponderantes nessa decisão. É de ressaltar o papel primordial que a análise sensorial desempenha neste tipo de estudo. Na verdade, esta vertente de análise é a única forma que o consumidor tem para avaliar a qualidade do produto, e tal como se constatou ao longo do presente trabalho, este é rejeitado principalmente por questões sensoriais, mesmo antes de serem atingidos limites críticos que coloquem em risco a saúde do consumidor.

Bibliografia

- Aberoumand, A. (2010). Occurrence of *Clostridium botulinum* in fish and fishery products in retail trade, A Review Article. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2(3), 246-250.
- Albarracín, W.; Sánchez, I.; Grau, R.; Barat, J. (2011). Salt in food processing; usage and reduction: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(7), 1329-1336.
- Ali, M.; Poortvliet, E.; Strömberg, R.; Yngve, A. (2011). Polyamines in foods: development of a food database. *Food & Nutrition Research*, 55, 1-15.
- Alpuche-Solís, A.; Paredes-López, O. (2001). biotechnology to improve shelf life and quality traits of foods. Em *Food Shelf Life Stability*. CRC Press, Cap. 10.
- André, S.; Zuber, F.; Remize, F. (2013). Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. *International Journal of Food Microbiology*, 165, 134-143.
- Ares, G.; Parentelli, C.; Gámbaro, A.; Lareo, C.; Lema, P. (2006). Sensory shelf life of shiitake mushrooms stored under passive modified atmosphere. *Postharvest Biology and Technology*, 41(2), 191-197.
- Aubourg, S. (1998). Lipid changes during long-term storage of canned tuna (*Thunnus alalunga*). *Z Lebensm Unters Forsch A*, 206, 33-37.
- Aubourg, S. (2001). Review: Loss of quality during the manufacture of canned fish products. *Food Science and Technology International*, 7, 199-215.
- Awuah, G.; Ramaswamy, H.; Economides, A. (2007). Thermal processing and quality: principles and overview. *Chemical Engineering and Processing*, 46, 584-602.
- Bandarra, N.; Batista, I.; Nunes, M.; Empis, J.; Christie, W. (1997). *Journal of Food Science*, 62(1), 40-42.
- Baranyi, J.; Roberts, T. (1995). Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 199-218.
- Barriuso, B.; Astiasarán, I.; Ansorena, D. (2013). A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging. *European Food Research and Technology*, 236, 1-15.
- Bastos, J.; Rocha, C. (2006). Análise de Sobrevivência – Conceitos Básicos. *Arquivos de Medicina*, 20, 185-187.
- Baty, F.; Delignette-Muller, M. (2004). Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? *International Journal of Food Microbiology*, 91(3), 261-277.
- Benedetti, S.; Sinelli, N.; Buratti, S.; Riva, M. (2005). shelf life of crescenza cheese as measured by electronic nose. *Journal of Dairy Science*, 88, 3044-3051.
- Berna, A.; Lammertyn, J.; Saevels, S.; Natale, C.; Nicolaï, B. (2004). Electronic nose systems to study shelf life and cultivar effect on tomato aroma profile. *Sensors and Actuators B*, 97, 324-333.
- Berk, Z. (2009). Thermal processing. Em *Food Process Engineering and Technology*. Academic Press, Cap. 17, p. 355-373.
- Beuchat, L. (1996). Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*, 59(2), 204-216.
- Binh, P.; Soda, K.; Kawakami, M. (2011). Mediterranean diet and polyamine intake: possible contribution of increased polyamine intake to inhibition of age-associated disease. *Nutrition and Dietary Supplements*, 3, 1-7.
- Blackburn, C. (2000). Modelling shelf-life. Em *The stability and shelf-life of food*. CRC Press, Cap 3, p. 55-75.
- Bleve, G.; Rizzoti, L.; Dellaglio, F.; Torriani, S. (2003). Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4116-4122.

- Bonilla, A.; Sveinsdottir, K.; Martinsdottir, E. (2007). development of quality index method (QIM) scheme for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets and application in shelf life study. *Food Control*, 18(4), 352-358.
- Calle, M.; Hough, G.; Curia, A.; Gómez, G. (2006). Bayesian survival analysis modeling applied to sensory shelf life of foods. *Food Quality and Preference*, 17, 307-312.
- Calligaris, S.; Pieve, S.; Kravina, G.; Manzocco, L.; Nicoli, C. (2008). Shelf life prediction of bread sticks using oxidation indices: a validation study. *Journal of Food Science*, 73(2), 51-56.
- Caplice, E.; Fitzgerald, G. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149.
- Cardelli, C.; Labuza, T. (2001). Application of weibull hazard analysis to the determination of the shelf life of roasted and ground coffee. *LWT-Food Science and Technology*, 34, 273-278.
- Carpenter, R.; Lyon, D.; Hasdell, T. (2000). What is sensory analysis used for?. Em *Guidelines For Sensory Analysis In Food Product Development And Quality Control*. 2ª ed. Aspen Publishers, Cap. 1, p. 1-11.
- Casal, S.; Oliveira, M.; Ferreira, M. (2002). Determination of biogenic amines coffee by an optimized liquid chromatographic method. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 25(16), 2535-2549.
- Ceylan, E. (2007). Coping with shelf-life: To help assure product safety and quality, microbiological shelf-life and challenge studies are essential R&D tools food processors and manufacturers. *Food Quality Magazine*, Dez/Jan, disponível em <http://www.foodquality.com> (consultado a 02/2014).
- Chaijan, M.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Faustman, C. (2006). Changes of lipids in sardine (*Sardinella gibbosa*) muscle during iced storage. *Food Chemistry*, 99, 83-91.
- Chaovanalikit, A.; Wrolstad, R. (2003). Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Journal of Food Science*, 69(1), 67-72.
- Chen, Y.; Jackson, K.; Chea, F.; Schaffner, D. (2001). Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. *Journal of Food Protection*, 64(1), 72-80.
- Codex Alimentarius (1997) (com todas as alterações até 2013). Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods, CAC/GL 21, p. 1-4, disponível em <http://www.codexalimentarius.com> (consultado a 03/2014).
- Codex Alimentarius (1969) (com todas as alterações até 2003). General principles of food hygiene, rev. 4, disponível em <http://www.codexalimentarius.com> (consultado a 03/2014).
- Codex Alimentarius (1979) (com todas as alterações até 2011). Code of hygienic practice for low and acidified low acid canned foods, CAC/RCP 23, p. 1-85, disponível em <http://www.codexalimentarius.com> (consultado a 04/2014).
- Codex Alimentarius (2003) (com todas as alterações até 2013). Code of practice for fish and fishery products, CAC/RCP 52, p. 1-238, disponível em <http://www.codexalimentarius.com> (consultado a 03/2014).
- Corbo, M.; Del Nobile, M.; Sinigaglia, M. (2006). A novel approach for calculating shelf life of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 69-73.
- Corradini, M.; Peleg, M. (2007). Shelf-Life estimation from accelerated storage data. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 37-47.
- Creed, C. (2001). The potential of foodservice systems for satisfying consumer needs. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(3), 219-227.
- Cruz, R.; Casal, S.; Mendes, E.; Costa, A.; Santos, C.; Morais, S. (2013). Validation of a single-extraction procedure for sequential analysis of vitamin e, cholesterol, fatty acids, and total fat in seafood. *Food Analytical Methods*, 6, 1196-1204.

- Decreto Lei nº375/98 de 24 de Novembro de 1998, Diário da República, I Série A. 272 (24-11-1998), 6461-6474.
- Diretiva do Conselho 91/493/CEE, de 21 de Julho de 1991, que adota as normas sanitárias relativas à produção e à colocação no mercado dos produtos de pesca; JO L 268 de 24.09.1991, p.15.
- Domingo, J.; Bocio, A.; Falcó, G.; Llobet, J. (2007) Benefits and risks of fish consumption Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. *Toxicology*, 230, 219-226.
- Domingo, J. (2007). Omega-3 fatty acids and the benefits of fish consumption: Is all that glitters gold?. *Environment International*, 33, 993-998.
- Elías, M.; Carrascosa, A. (2010). Characterisation of the paio do alentejo, a traditional portuguese iberian sausage, in respect to its safety. *Food Control*, 21, 97-102.
- Ellis, D.; Goodacre, R. (2001). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: current status and future trend. *Food Science & Technology*, 12, 414-424.
- El-Marrakchi, A.; Bennour, M.; Bouchriti, N.; Hamama, A.; Tagafait, H. (1990). Sensory, chemical, and microbiological assessments of moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *Journal of Food Protection*, 7, 550-631.
- Emblem, A. (2000). Predicting packaging characteristics to improve shelf-life. Em *The stability and shelf-life of food*. CRC Press, Cap.7, p. 145-169.
- Erim, F. (2013). Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 52, 239-247.
- Escobedo-Avellaneda, Z.; Velazquez, G.; Torres, J.; Welti-Chanes, J. (2012). Inclusion of the variability of model parameters on shelf-life estimations for low and intermediate moisture vegetables. *LWT – Food Science and Technology*, 47, 364-370.
- Evancho, M.; Tortorelli, S.; Scott, V. (2009). Microbiological spoilage of canned foods. Em *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. Springer, Cap. 7, p. 185-221.
- Evangelista, N.; Ogawa, N.; Ogawa, M. (2000). Determinação do óxido de trimetilamina (OTMA) e trimetilamina (TMA) em pescado. *Revista Científica de Produção Animal*, 2(2), 168-177.
- FAO (2014) - Food and Drug Organization. Fisheries and aquaculture department, disponível em <http://www.fao.org> (consultado a 03/2014) .
- FAO/WHO (2003) - Food and Drug Organization/ World Health Organization. Assuring food safety and quality: guidelines for strengthening national food control systems, disponível em <http://www.fao.org> (consultado a 05/2014).
- FAO/WHO (2010) - Food and Drug Organization/ World Health Organization. Joint FAO/WHO Expert consultation on the risks and benefits of fish consumption. *FAO Fisheries and Aquaculture Report*, R978, disponível em <http://www.fao.org> (consultado a 06/2014).
- FAO/WHO (2012)- Food and Drug Organization/ World Health Organization. Joint FAO/WHO Expert meeting on the public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products. *FAO headquarters*, disponível em <http://www.fao.org> (consultado a 06/2014).
- Farag, M. (2013). Estimation of formatting biogenetic amines concentration in fresh and processed sardine fish products during different storage conditions. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 5(6), 628-636.
- FDA (2011) - Food and Drug Administration. Scombrototoxin (Histamine) formation. Em *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*, 4ª ed., Department of Health and Human Services, USA, Cap.7, p. 113-152.
- FDA (2014) - Food and Drug Organization. Thermally Processed Low-Acid Foods Packaged in Hermetically Sealed Containers. Code of Federal Regulations, Título 21(2), Parte 113, disponível em <http://www.fao.org> (consultado a 03/2014).

- Francis, F. (1995). Quality as influenced by color. *Food Quality and Preference*, 6, 149-155.
- FSAI (2005) - Food Safety Authority of Ireland. Guidance Note N.º18 – Determination of food shelf-life. Dublin, Ireland, disponível em <http://www.fsai.ie> (consultado 12/2013).
- Galić, K.; Curić, D.; Gabrić, D. (2009). Shelf life of packaged bakery goods – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 405-426.
- Galić, K. (2009). A fresh perspective: looking at the shelf life of packaged food. *Food Engineering & Ingredients*, 34, 17-19.
- Ghaly, A.; Dave, D.; Budge, S.; Brooks, M. (2010). Fish spoilage mechanisms and preservation techniques: review. *American Journal of Applied Sciences*, 7(7), 859-877.
- Giménez, A.; Varela, P.; Salvador, A.; Ares, G.; Fiszman, S.; Garitta, L. (2007). Shelf life estimation of Brown pan bread: A consumer approach. *Food Quality and Preference*, 18, p. 196-204.
- Giménez, A.; Ares, F.; Ares, G. (2012). Sensory shelf-life estimation: a review of current methodological approaches. *Food Research International*, 49, 311-325.
- Gladyshev, M.; Sushchik, N.; Makhutova, O.; Kalachova, G. (2009). Content of essential polyunsaturated fatty acids in three canned fish species. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(3), 224-230.
- Gomes, C. (2007). Critérios Microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 2, 48-51.
- Gómez, M.; Lorenzo, J. (2012). Effect of packaging conditions on shelf-life of fresh foal meat. *Meat Science*, 91, 513-520.
- Gould, G. (1996). Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 51-64.
- Gracias, K.; McKillip, J. (2004). A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 883-890.
- Gram, L.; Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 262-266.
- Guillet, M.; Rodrigue, N. (2010). Shelf life testing methodology and data analysis. Em *Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide*. CRC Press, Cap. 3, p. 31-53.
- Hocaoğlu, A.; Demirci, A.; Gümüş, T.; Demirci, M. (2012). Effects of gamma irradiation on chemical, microbial quality and shelf life of shrimp. *Radiation Physics and Chemistry*. 81, 1923-1929.
- Holmes, J.; Boss, K.; Herming, J. (1979). Bask food preservation and deterioration modes. Em *Open Shelf-Life Dating of Food*. OTA, p. 77-85, Appendix B.
- HPA (2009) - Health Protection Agency. Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market, disponível em <https://www.gov.uk> (consultado a 04/2012).
- Hornero-Méndez, D.; Garrido-Fernandéz, A. (1994). Biogenic amines in table olives. Analysis by High-performance Liquid Chromatography. *Analyst*, 119, 2037-2041.
- Hough, G.; Sánchez, R.; Pablo, G.; Sánchez, R.; Villaplana, S.; Giménez, A.; Gámbaro, A. (2002). Consumer acceptability versus trained sensory panel scores of powdered milk shelf-life defects. *Journal of Dairy Science*, 85(9), 2075-2080.
- Hough, G.; Langohr, K.; Gómez, G.; Curia, A. (2003). Survival analysis applied to sensory shelf life of foods. *Journal of Food Science*, 68(1), 359-362.
- Hough, G. (2010a). Design of sensory shelf-life experiments. Em *Sensory Shelf Life Estimation of Food Products*. CRC Press, Cap. 3, p. 63-82.
- Hough, G. (2010b). Survival analysis applied to sensory shelf life. Em *Sensory Shelf Life Estimation of Food Products*. CRC Press, Cap. 4, p. 83-111.

- Howgate, P. (2009). Traditional methods. Em *Fishery Products Quality, safety and authenticity*. Wiley, Cap. 2, p. 19-35.
- Hu, Y.; Huang, Z.; Li, J.; Yang, H. (2012). Concentrations of biogenic amines in fish, squid and octopus and their changes during storage. *Food Chemistry*, 135, 2604-2611.
- Huss, H. (1995a). Chemical Composition. Em *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper – 348, Cap. 4, disponível em <http://www.fao.org> (consultado a 03/2014).
- Huss, H. (1995b). Post Mortem Changes in Fish. Em *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper – 348, Cap. 5, disponível em <http://www.fao.org> (consultado a 03/2014).
- Huss, H. (1995c). Assessment of Fish Quality. Em *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO Fisheries Technical Paper – 348, Cap. 8, disponível em <http://www.fao.org> (consultado a 03/2014).
- INSA (2005) – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração, *Revista da Ordem dos Farmacêuticos*, 64, p. 66-68, disponível em <http://www.insa.pt> (consultado a 04/2013).
- INSA (2006) – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e WHO – World Health Organization. Cinco Chaves para uma Alimentação mais Segura – Manual, disponível em <http://www.insa.pt> (consultado a 12/2013).
- ISO 6887-5:2000 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products, meat and meat products, fish product.
- ISO 4833:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30°C.
- ISO 15213:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions.
- ISO 7218:2007 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.
- ISO 4833-2:2013 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 2: Colony count at 30°C by the surface plating technique.
- Jabeen, F.; Chaudhry, A. (2011). Chemical compositions and fatty acid profiles of three freshwater fish species. *Food Chemistry*, 125, 991-996.
- Jay, J.; Loessner, M.; Golden, D. (2005). Food protection with high temperatures. Em *Modern Food Microbiology*. Springer, Cap. 17, p. 415-441.
- Kalač, P.; Krausová, P. (2005). A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, 90, 219-230.
- Kilcast, D.; Subramaniam, P. (2000). Introduction. Em *The stability and shelf-life of food*. CRC Press, Cap. 1, p. 1-19.
- Kilinc, B.; Cakli, S. (2005). Determination of the shelf life of sardine (*Sardina pilchardus*) marinades in tomato sauce stored at 4°C. *Food Control*, 16, 639-644.
- Kotzekidou, P. (1997). Heat resistance of *Byssoschlamys nivea*, *Byssoschlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. *Journal of Food Science*, 62 (2), 410-412.
- Koutsimanis, G.; Getter, K.; Behe, B.; Harte, J.; Almenar, E. (2012). Influences of packaging attributes on consumer purchase decisions for fresh produce. *Appetite*, 59, 270-280.
- Kusumaningrum, H.; Riboldi, G.; Hazeleger, W.; Beumer, R. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 227-236.

- Landry, W.; Schwab, A.; Lancette, G. (2001). Examination of canned foods. Em *Bacteriological Analytical Manual*. FDA, Cap. 21A, disponível em <http://www.fda.gov> (consultado a 03/2014).
- Larousse, J.; Brown, B. (1997). Containers for canned foods. Em *Food Canning Technology*. Wiley-VCH, Cap. 9, p. 297-332.
- Lawless, H.; Heymann, H. (2010). Introduction. Em *Sensory Evaluation of Food. Principles and Practices*. 2ª ed. Springer, Cap. 1, p. 1-17.
- Losada, V.; Rodríguez, A.; Ortiz, J.; Aubourg, S. (2006). Quality enhancement of canned sardine (*Sardina pilchardus*) by a preliminary slurry ice chilling treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(7), 598-605.
- Lukoshkina, M.; Odoeva, G. (2003). Kinetics of chemical reactions for prediction of quality of canned fish during storage. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39(3), 363-369.
- Luthria, D.; Pastor-Corrales, M. (2006). Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 205-211.
- MacDougall, D. (2002a). The perception and sensory assessment of colour. Em *Colour in food*. CRC Press, Cap. 2, p. 9-30.
- MacDougall, D. (2002b). Colour measurement of food. Em *Colour in food*. CRC Press, Cap. 3, p. 33-60.
- Manzocco, L.; Lagazio, C. (2009). Coffee brew shelf life modeling by integration of acceptability and quality data. *Food Quality and Preference*, 20, 24-29.
- Manzocco, L. (2012). The acceptability limit. Em *Shelf Life Assessment of Food*. CRC Press, Cap. 3, p. 37-58.
- Marin, M.; Polak, T.; Gasperlin, L.; Zlender, B. (2010). Variations in the fatty acid composition and nutritional value of adriatic sardine (*Sardina pilchardus* Walb.) through the fishing season. *Acta agriculturae Slovenica*, 96(2), 95-101.
- McDonald, K.; Sun, D. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 1-27.
- McMahon, W. (2012). Continuing quest for longer product shelf-life – Shelf-life studies are an indispensable product development tool. *Food Safety & Quality*, 7.
- McMeekin, T.; Olley, J.; Ratkowsky, D.; Ross, T. (2002). Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 395-407.
- Medina, I.; Sacchi, R.; Biondi, L.; Aubourg, S.; Paolillo, L. (1998). Effect of packing media on the oxidation of canned tuna lipids. Antioxidant effectiveness of extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1150-1157.
- Mizrahi, S. (2000). Accelerated shelf-life tests. Em *The stability and shelf-life of food*. CRC Press, Cap.5, p. 107-125.
- Monraia, C.; Loja, F.; Ribeiro, J.; Garcez, M. (2006). Código de boas práticas de conservas de sardinha e do tipo sardinha. *ALIF - Associação da Indústria Alimentar pelo Frio*.
- Nakashima, S.; André, C.; Franco, B. (2000). Revisão: Aspectos básicos da microbiologia preditiva. *Brazilian Journal of Food Technology*, 3, 41-51.
- Naseri, M.; Rezaei, M.; Moieni, S.; Hosseini, H.; Eskandari, S. (2011). Effects of different filling media on the oxidation and lipid quality of canned silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *International Journal of Food Science & Technology*, 46, 1149-1156.
- Neumeyer, K.; Ross, T.; McMeekin, T. (1997). Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage pseudomonas. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 45-54.
- Nicoli, M. (2012). An Introduction to food shelf life: definitions, basic concepts, and regulatory aspects. Em *Shelf Life Assessment of Food*. CRC Press, Cap. 1, p. 1-16.

- NP 2309-1:1998 - Microbiologia Alimentar - Conservas. Parte 1: Apreciação da estabilidade. Provas de estufa.
- NP 2309-2:1998 - Microbiologia Alimentar - Conservas. Parte 2: Apreciação da esterilidade.
- NSWFA (2010) - New South Wales Food Authority. Shelf life testing - 'Use-by' dates for food safety. Newington, New South Wales, disponível em <http://www.foodauthority.nsw.gov.au> (consultado a 12/2013).
- NZFSa (2005) - New Zealand Food Safety Authority. A guide to calculating the shelf life of foods. Wellington, New Zealand, disponível em <http://www.nzfsa.govt.nz> (consultado a 01/2014).
- Önal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103, 1475-1486.
- Opara, L.; Al-Jufaili, S.; Rahman, M. (2007). Postharvest handling and preservation of fresh fish and seafood. Em *Handbook of Food Preservation*, CRC Press, 2ª ed., Cap. 6, p. 151-172.
- Oranusi, U.; Wesley, B.; Osigwe, G. (2012). Investigation on the microbial profile of canned foods. *Journal of Biological and Food Science Research*, 1(1), 15-18.
- Ovca, A.; Jevšnik, M. (2009). Maintaining a cold chain from purchase to the home and at home: Consumer opinions. *Food Control*, 20, 167-172.
- Oyelese, O.; Opatokun, M. (2007). Exposure time on bacteria flora/count and shelf life of canned sardine (*Sardinella pilchardus*) under ambient and cold storage conditions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 31, 517-530.
- Özoğul, F.; Özoğul, Y. (2000). Comparison of Methods Used for Determination of Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N) in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Zoology*, 24, 113-120.
- Özogul, F.; Taylor, K.; Quantick, P.; Özogul, Y. (2002). Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 515-522.
- Özogul, Y.; Özyurt, G.; Özogul, F.; Kuley, E.; Polat, A. (2005). Freshness assessment of European eel (*Anguilla anguilla*) by sensory, chemical and microbiological methods. *Food Chemistry*, 92, 745-751.
- Papastergiadis, A.; Mubiru, E.; Langenhove, H.; Meulenaer, B. (2012). Malondialdehyde measurement in oxidized foods: evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) Test in Various Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9589-9594.
- Park, J.; Lee, C.; Known, E.; Lee, H.; Kim, J.; Kim, S. (2010). Monitoring the contents of biogenic amines in fish and fish products consumed in Korea. *Food Control*, 21, 1219-1226.
- Parkar, J.; Rakesh, M. (2014). Leaching of elements from packaging material into canned foods marketed in India. *Food Control*, 40, 177-184.
- Pathare, P.; Opara, U.; Al-Sahid, F. (2013). Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. *Food Bioprocess Technology*, 6, 36-60.
- Patsias, A.; Chouliara, I.; Badeka, A.; Savva, I.; Kontominas, M. (2006). Shelf-life of a chilled precooked chicken product stored in air and under modified atmospheres: microbiological, chemical, sensory attributes. *Food Microbiology*, 23, 423-429.
- Pedro, A.; Ferreira, M. (2006). Multivariate accelerated shelf-life testing: a novel approach for determining the shelf-life of foods. *Journal of Chemometrics*, 20, 76-83.
- Pérez-Jiménez, J.; Arranz, S.; Taberner, M.; Díaz-Rubio, M.; Serrano, J.; Goñi, I.; Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41, 274-285.

- Pérez-Villarreal, B.; Pozo, R. (1990). Chemical composition and ice spoilage of Albacore (*Thunnus alalunga*). *Journal of Food Science*, 55(3), 678-682.
- Poli, B. (2005). Quality and certification of fishery products from both capture and farming in the same market place. Em *Interaction between aquaculture and capture fisheries: a methodological perspective*. FAO, Studies and Reviews N°78, disponível em <http://www.fao.org> (consultado a 01/2014).
- Prester, L. (2011). Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. *Food Additives and Contaminants*, 28(11), 1547-1560.
- Ramirez (2014). Fichas técnicas dos produtos.
- Ray, B. (2004). Spoilage of specific foods group. Em *Fundamental Food Microbiology*. CRC Press, Cap. 19, p. 269-288.
- Ray, B.; Bhunia, A. (2008a). Characteristics of predominant microorganisms in food. Em *Fundamental Food Microbiology*. 4ª ed. CRC Press, Cap. 2, p. 11-28.
- Ray, B.; Bhunia, A. (2008b). Microorganisms used in food fermentation. Em *Fundamental Food Microbiology*. 4ª ed. CRC Press, Cap. 10, p. 99-106.
- Ray, B.; Bhunia, A. (2008c). Important factors in microbial food spoilage. Em *Fundamental Food Microbiology*. 4ª ed. CRC Press, Cap. 18, p. 201-208.
- Regulamento (CE) n.º178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios; JO L 31 de 1.2.2002, p. 1.
- Regulamento (CE) n.º2073/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios; JO L 338 de 22.12.2005, p.1.
- Regulamento (CE) n.º2074//2005 da Comissão , de 5 de Dezembro de 2005, que estabelece medidas de execução para determinados produtos ao abrigo do Regulamento (CE) n°853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e para a organização de controlos oficiais ao abrigo dos Regulamentos (CE) n°854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e n°882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho que derroga o Rgeulamento (CE) n°852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho e altera os Regulamentos (CE) n°853/2004 e (CE) n°854/2004; JO L 338 de 22.12.2005, p.27.
- Regulamento (CE) n°1441/2007 da Comissão, de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n° 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios; JO L 322 de 7.12.2007, p. 12.
- Regulamento (CE) n.º1022/2008 da Comissão, de 17 de Outubro de 2008, que altera o Regulamento (CE) n.º2074/2005, relativo aos limites de azoto básico volátil total (ABVT); JO L 277 de 18.10.2008, p. 18.
- Regulamento (UE) n°1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n° 1924/2006 e (CE) n° 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Diretivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) n° 608/2004 da Comissão; JO L 304 de 22.11.2011, p.18.
- Rickman, J.; Barret, D.; Bruhn, C. (2007). Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins C and B and phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 930-944.
- Robertson, G. (2000) Shelf Life of packaged foods, its measurement and prediction. Em *Food Packaging: Principles and Practices*. CRC Press, Cap. 13.
- Robertson, G. (2010). Food packaging and shelf life. Em *Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide*. CRC Press, Cap. 1, p. 1-16.

- Rodrigues, M.; Bittencourt, J.; Matos, E.; Reis, D. (2011). Inovação em métodos analíticos microbiológicos na indústria alimentícia. *Latin American Journal of Business Management*, 2(2), 54-81.
- Rodríguez, A.; Carriles, N.; Gallardo, J.; Aubourg, S. (2009). Chemical changes during farmed coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) canning: Effect of a preliminary chilled storage. *Food Chemistry*, 112, 362-328.
- Rodríguez-Gamboa, J.; Albarracín-Estrada, E.; Delgado-Trejos, E. (2011). Quality Control Through Electronic Nose System. Em *Modern Approaches To Quality Control*. Intech, Cap. 27, p. 505-522.
- Ross, R.; Morgana, S.; Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3-16.
- Rumpf, A. (2008). Shelf-life and challenge studies play a key role in validating quality and safety. *Food Quality Magazine*, Dez/Jan, disponível em <http://www.foodquality.com> (consultado a 02/2014).
- Rybka-Rodgers, S. (2001). Improvement of food safety design of cook-chill foods. *Food Research International*, 34, 449-455.
- Sadler, G.; Murphy, P. (2010). pH and titratable acidity. Em *Food Analysis*. Springer, Cap. 13, p. 219-238.
- Saevels, S.; Lammertyn, J.; Berna, A.; Veraverbeke, E.; Natale, C.; Nicolai, B. (2004). An electronic nose and a mass spectrometry-based electronic nose for assessing apple quality during shelf life. *Postharvest Biology and Technology*, 31, 9-19.
- Saguy, I.; Peleg, M. (2009). Accelerated and parallel storage in shelf life studies. Em *An Integrated Approach to New Food Product Development*. CRC Press, Cap. 25, p. 429-455.
- Sallam, K. (2007). Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. *Food Chemistry*, 101, 592-600.
- Sant'Anna, V.; Gurak, P.; Marczak, L.; Tessaro, I. (2013). Tracking bioactive compounds with colour changes in foods – A review. *Dyes and Pigments*, 98, 601-608.
- Schaller, E.; Bosset, J.; Escher, F. (1998). "Electronic Noses" and their application to food. *Food Science and Technology*, 31(4), 305-316.
- Selmi, S.; Sadok, S. (2007). Change in lipids quality and fatty acids profile of two small pelagic fish: sardinella aurita and sardina pilchardus during canning process in olive oil and tomato sauce respectively. *Bulletin de l'Institut National des Sciences et Technologies Mer de Salammbô*, 34, 91-97.
- Selmi, S.; Monser, L.; Sadok, S. (2008). The influence of local canning process and storage on pelagic fish from tunisia: fatty acid profiles and quality indicators. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32(3), 443-457.
- Sewald, M.; De Vries, J. (s.d.). Food product shelf life. *Medallion Laboratories – Analytical Progress*, disponível em <http://www.medlabs.com> (consultado a 12/2013).
- Shahidi, F.; Zhong, Y. (2005). Lipid oxidation: measurement methods. Em *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. 6ª ed. John Wiley & Sons, Cap. 8, 357-385.
- Shakila, R.; Jeyasekaran, G.; Princy Vyla, S.; Kumar, R. (2005). Effect of delayed processing on changes in histamine and other quality characteristics of 3 commercially canned fishes. *Food Microbiology and Safety*, 70(1), 24-28.
- Singh, R. (2000). Scientific principles of shelf-life evaluation. Em *Shelf Life Evaluation of Foods*. 2ª ed. Aspen Publishers, Cap.1, p. 3-20.
- Siriamornpun, S.; Yang, L.; Kubola, J.; Li, D. (2008). Changes of omega-3 fatty acid content and lipid composition in canned tuna during 12-month storage. *Journal of Food Lipids*, 15, 164-175.

- Singh, P.; Wani, A.; Saengerlaub, S.; Langowski, H. (2011). Understanding critical factors for the quality and shelf-life of MAP fresh meat: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 146-177.
- Sivertsvik, M.; Jeksrud, W.; Rosnes, J. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 107-127.
- Soares, K.; Gonçalves, A. (2012). Aplicação do método do índice de qualidade (MIQ) para o estudo da vida útil de filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sem pele, armazenados em gelo. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(6), 2289-2300.
- Song, W.; Derito, C.; Liu, M.; He, X.; Dong, M.; Liu, R. (2010). Cellular antioxidant activity of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6621-6629.
- Stephen, N.; Shakila, R.; Jeyasekaran, G.; Sukumar, D. (2010). Effect of different types of heat processing on chemical changes in tuna. *Journal of Food Science and Technology*, 47(2), 174-181.
- Subramaniam, P. (2010). Off the shelf, onto the table. *Chemistry & Industry*, Agosto, p. 23-25.
- Sveinsdottir, K.; Martinsdottir, E.; Hyldig, G.; Jørgensen, B.; Kristbergsson, K. (2002). Application of Quality Index Method (QIM) Scheme in Shelf-life Study of Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science*, 67(4), 1570-1575.
- Svenier, V.; Delannoy, S.; André, S.; Fach, P.; Remize, F. (2012). Prevalence of *Clostridium botulinum* and thermophilic heat-resistant spores in raw carrots and green beans used in French canning industry. *International Journal of Food Microbiology*, 155, 263-268.
- Szczesniak, A. (2002). Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, 13, 215-225.
- Taoukis, P.; Labuza, T. (1989). Applicability of time-temperature indicators as shelf life monitors of food products. *Journal of Food Science*, 54, 783-788.
- Tato, I. e Martins, B. (2000). Boas práticas de fabrico para a indústria de conservas de peixe. AESBUC – Associação para a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica.
- Turkmen, N.; Sari, F.; Velioglu, Y. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*, 93, 713-718.
- Uriarte-Montoya, M.; Vilalba-Vilalba, A.; Pacheco-Aguilar, R.; Ramirez-Suarez, J.; Lugo-Sánchez, M.; García-Sánchez, G.; Carvalho Ruiz, M. (2010). Changes in quality parameters of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *Food Chemistry*, 122, 482-487.
- Valero, A.; Carrasco, E.; García-Gimeno, R. (2012). Principles and Methodologies for the Determination of Shelf-Life in Foods. Em *Trends in Vital Food and Control Engineering*. InTech, Cap. 1, p. 3-42.
- Varela, P.; Salvador, A.; Fiszman, S. (2005). Shelf-life estimation of “Fuji” apples: sensory characteristics and consumer acceptability. *Postharvest Biology and Technology*, 38, 18-24.
- Veciana-Nogués M.; Mariné-Font A.; Vidal-Carou M. (1997). Biogenic amines in fresh and canned tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4324-4328.
- Verbeke, W.; Vermeir, I.; Brunsø, K. (2007). Consumer evaluation of fish quality as basis for fish market segmentation. *Food Quality and Preference*, 18, 651-661.
- Viegas, S. (2009). Alterações do estado de saúde associadas à alimentação –contaminação microbiológica dos alimentos. INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, disponível em <http://www.insa.pt> (consultado a 01/2014).
- Visciano, P.; Schirone, M.; Tofalo, R.; Suzzi, G. (2012). Biogenic amines in raw and processed seafood. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-10.
- Warne, D. (1988). Food and Drug Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, disponível em <http://www.fao.org> (consultado a 04/2014).

- Washi, S. (2012). Awareness of food labeling among consumers in Groceries in Al-Ain, United Arab Emirates. *International Journal of Marketing Studies*, 4(1), 38-46.
- Watanabe, S.; Melby, M.; Aiba, N. (2009). Food safety and food labeling from the viewpoint of the consumers. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 18(4), 532-537.
- Wheeler, S.; Morrissey, M. (2008). Quantification and distribution of lipid, moisture, and fatty acids of West Coast Albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 12(2), 3-16.
- Willock, A.; Pun, M.; Khanona, J.; Aung, M. (2004). Consumer attitudes, knowledge and behaviour: a review of food safety issues. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 56-66.